

# Einfluss von naher Infrarotstrahlung in Kombination mit ionisierender Strahlung auf Zellen der Haut



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

Dem Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von

**Dipl.-Biol. Anke König**

aus Frankfurt am Main

1. Referent: Prof. Dr. Paul G. Layer

2. Referent: Prof. Dr. Markus Löbrich

Tag der Einreichung: 03.08.2016

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2016

Darmstadt 2016

D17



---

## Inhaltsverzeichnis

---

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Die Haut – Funktion und Aufbau	3
2.2. Hautmodelle – Alternative zur klassischen Zellkultur	7
2.3. Strahlung	10
2.3.1. Nahes Infrarot (NIR)	10
2.3.2. Ionisierende Strahlung	13
2.3.3. NIR und Röntgenstrahlung – Vergleich und Kombination	16
2.4. Zelluläre Mechanismen der DNA-Doppelstrangbruchreparatur	19
2.4.1. Erkennung und Markierung von DNA-Doppelstrangbrüchen	19
2.4.2. DSB-Reparaturkaskaden	20
2.5. Proteine und Signalwege	23
2.5.1. PARP-1 ( <i>Poly (ADP-ribose) polymerase 1</i> )	23
2.5.2. FOXM1 ( <i>Forkhead box protein M1</i> ) -Signalweg	25
2.5.3. Apoptose und Stress Signaling	27
2.6. Sekundäre Botenstoffe im Zellmetabolismus	30
2.6.1. $\text{Ca}^{2+}$ ( <i>Calcium</i> )	30
2.6.2. cAMP ( <i>Cyclisches Adenosinmonophosphat</i> )	32
2.6.3. ROS ( <i>Reaktive Sauerstoffspezies</i> )	34
2.7. Zielsetzung	37

---

3.	Material und Methoden	39
3.1.	Material	39
3.1.1.	Chemikalien und Puffer	39
3.1.2.	Gelzusammensetzung Western Blot	41
3.1.3.	Zellen, Medien, Zusätze und Lösungen für die Zellkultur	42
3.1.4.	Enzyme, Längenstandards, sonstige Proteine, verwendete Kits	44
3.1.5.	Primäre Antikörper für Immunfluoreszenz	44
3.1.6.	Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz	45
3.1.7.	Primäre Antikörper für Western Blot	45
3.1.8.	Sekundäre Antikörper für Western Blot	45
3.1.9.	Primer (human)	46
3.1.10.	PathScan® – Liste der Proteine und posttranslationalen Modifikationen	46
3.1.11.	Geräte	47
3.1.12.	Programme	49
3.1.13.	Sonstige Verbrauchsmaterialien	49
3.2.	Methoden	50
3.2.1.	Zellkultur mit Zelllinien	50
3.2.2.	Kultivierung humaner Vollhautmodelle	51
3.2.3.	Bestrahlungen	55
3.2.4.	Fixierungen für histochemische Analysen	57
3.2.5.	Herstellung von Gefrierschnitten	57
3.2.6.	Immunhistologische Methoden	58
3.2.7.	Lebendfärbung	59
3.2.8.	Molekularbiologische Methoden	60
3.2.9.	Protein- und Molekülanalysen	62
3.2.10.	Auswertung der verschiedenen Endpunkte im humanen Vollhautmodell	69
3.2.11.	Auswertung der verschiedenen Endpunkte der Monolayerzellkultur	70

---

---

4.	Ergebnisse – Hautmodelle	72
4.1.	Etablierung eines humanen Vollhautmodells für strahlenbiologische Fragestellungen	72
4.1.1.	DSB-Reparatur in humanen Hautmodellen	73
4.2.	Einfluss naher Infrarotstrahlung auf die röntgeninduzierte Schadensantwort in FTSM	78
4.2.1.	DSB-Reparatur nach Doppelbestrahlung	78
4.2.2.	Wirkung von NIR auf die röntgeninduzierte Apoptoserate in FTSM	82
4.2.3.	Einfluss von NIR und Röntgenstrahlen auf das Proliferationsverhalten von Zellen im FTSM	83
5.	Ergebnisse – molekulare Mechanismen	87
5.1.	Einfluss von NIR und ionisierender Strahlung auf den Chromatinstatus von Zellen	87
5.2.	Untersuchung des Expressionslevels von <i>Poly (ADP-ribose) polymerase 1</i> (PARP-1) nach kombinierter Bestrahlung	91
5.3.	Einfluss von NIR-Vorbestrahlung auf den FOXM1-Signalweg	93
5.4.	PathScan® Stress and Apoptosis Signaling	99
5.5.	Einfluss von NIR und Röntgenstrahlung auf den Metabolismus von Zellen	103
5.5.1.	Untersuchung des zytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts nach der kombinierten Bestrahlung	103
5.5.2.	cAMP-Spiegel nach NIR und der Kombination von NIR mit Röntgenstrahlung	105
5.5.3.	Messung der <i>Superoxid Dismutase</i> -Aktivität nach der kombinierten Bestrahlung mit NIR und Röntgenstrahlung	109
5.6.	wIRA und NIR im Vergleich	110
5.6.1.	BrdU-Aufnahmerate nach wIRA und wIRA kombiniert mit ionisierender Strahlung	111
5.6.2.	ROS-Induktion nach wIRA und nach wIRA in Kombination mit Röntgenstrahlung	114
6.	Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse	117

---

---

7.	Diskussion	121
7.1.	Etablierung eines humanen Vollhautmodells für strahlenbiologische Fragestellungen	122
7.2.	NIR hat im FTSM Einfluss auf die strahleninduzierte Stressantwort	124
7.2.1.	DSB-Reparatur in kombiniert bestrahlten FTSM	125
7.2.2.	Einfluss der kombinierten Bestrahlung auf Apoptose und Proliferation im FTSM	128
7.2.3.	Relevanz der erbrachten Ergebnisse für zukünftige Patienten	132
7.3.	Mechanismusaufklärung	134
7.3.1.	Einfluss von NIR auf Faktoren der DNA-Doppelstrangbruchreparatur	134
7.3.2.	Einfluss von NIR auf die Entstehung röntgeninduzierter <i>Mitotischer Katastrophen</i>	140
7.3.3.	NIR hat Einfluss auf den zellulären Metabolismus	143
7.3.4.	Abhängigkeit des NIR-Einflusses von Dosis vs. Expositionsdauer	145
7.4.	Fazit	149
8.	Anhang	151
8.1.	Einfluss naher Infrarotstrahlung auf basale Keratinozyten in der Maushaut und im Epidermismodell	151
	Literaturverzeichnis	152
	Publikationsliste	166
	Lebenslauf	167
	Danksagung	169
	Ehrenwörtliche Erklärung	171

---

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1:	Schematischer Querschnitt der Haut. ....	3
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Epidermis. ....	5
Abbildung 3:	Querschnitt eines auf MatriDerm® basierenden Vollhautmodells (FTSM). ....	9
Abbildung 4:	Elektromagnetisches Spektrum. ....	11
Abbildung 5:	Eindringtiefe naher Infrarotstrahlung (NIR) in die Haut. ....	13
Abbildung 6:	Darstellung der verschiedenen Wechselwirkungen elektromagnetischer Strahlung mit Materie. ....	15
Abbildung 7:	Zeitlicher Verlauf der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur. ....	22
Abbildung 8:	Darstellung der Wirkweise von PARP und PARG. ....	24
Abbildung 9:	Übersicht der verschiedenen Faktoren, deren Expression durch FOXM1 reguliert wird. ....	26
Abbildung 10:	Darstellung der 4 Phasen eines zellulären Calciumsignals. ....	31
Abbildung 11:	Enzymatische Spaltung von ATP zu cAMP und Pyrophosphat durch die Adenylcyclase (AC). ....	33
Abbildung 12:	Überblick über die verschiedenen ROS sowie die zellulären Redoxmechanismen ..	35
Abbildung 13:	Zeitschema der Herstellung humaner Vollhautmodelle. ....	55
Abbildung 14:	Darstellung der laboreigenen Bestrahlungsapparatur (A) sowie eines Querschnitts des Hydrosun®-Strahlers (B) mit dessen jeweiligem Bestrahlungsspektrum. ....	56
Abbildung 15:	Prinzip PathScan® Antibody Arrays. ....	64
Abbildung 16:	Zusammenbau eines PathScan® Antibody Array-Riegels. ....	65
Abbildung 17:	Pipettierschema <i>Superoxide Dismutase</i> (SOD) Activity Assay Kit. ....	69
Abbildung 18:	In den humanen Hautmodellen lassen sich mittels immunhistochemischer Färbung 15 min nach ionisierender Strahlung colokalisierend $\gamma$ H2AX- und 53BP1-markierte DNA-Doppelstrangbrüche nachweisen. ....	74
Abbildung 19:	Zellen im humanen Vollhautmodell weisen 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy Röntgen einen signifikanten Anstieg an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) auf. ....	75

Abbildung 20:	Nach der Bestrahlung mit unterschiedlichen Röntgendosen zeigt sich, dass auch im Hautmodell die Anzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen dosisabhängig ist. ....	76
Abbildung 21:	Die humanen Hautmodelle weisen eine gewebetypische Reparaturkinetik auf. ....	77
Abbildung 22:	In Keratinozyten (B), nicht aber in den Fibroblasten (A) der humanen Hautmodelle hat die Vorbestrahlung mit NIR einen signifikanten Einfluss auf die Induktion von 53BP1-Foci. ....	79
Abbildung 23:	Die Vorbestrahlung mit NIR führt 4 h nach der Bestrahlung mit 4 Gy zu einer signifikant höheren Persistenz unreparierter DSBs in FTSM, dieser reparaturhemmende NIR-Effekt kehrt sich jedoch bei 10 Gy um.....	80
Abbildung 24:	24 h nach der Bestrahlung mit 4 Gy zeigt sich in NIR vorbestrahlten Fibroblasten (A) nach wie vor ein signifikant höheres 53BP1-Foci Level, wohingegen sich dieses in Keratinozyten (B) nur noch tendenziell zeigt. ....	81
Abbildung 25:	Durch ionisierende Strahlung kommt es zu einem signifikanten Anstieg TUNEL-positiver Fibroblasten im FTSM, die Vorbestrahlung mit NIR hingegen führt zu einer verminderten Anzahl dieser röntgeninduzierten Apoptosen. ....	83
Abbildung 26:	Die Bestrahlung mit wassergefiltertem Infrarot A hat keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation der basalen Keratinozyten im humanen Hautmodell. ....	84
Abbildung 27:	NIR hat keinen signifikanten Einfluss auf die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 in basalen Keratinozyten. ....	85
Abbildung 28:	Die Bestrahlung mit NIR hat eine proliferationsfördernde Wirkung, die so stark ist, dass auch in den kombiniert bestrahlten Proben ein signifikant höherer Anteil Zellen trotz der ionisierenden Bestrahlung proliferiert (A), die Anzahl Ki-67 positiver Zellen ist jedoch sowohl in den mit 4 Gy als auch in den doppelbestrahlten FTSM reduziert (B). ....	86
Abbildung 29:	NIR sowie die Kombination aus NIR und Röntgenstrahlen beeinflusst den Heterochromatinstatus von NIH/3T3-Zellen. ....	88
Abbildung 30:	NIR und die kombinierte Bestrahlung aus NIR und 4 Gy haben keinen Einfluss auf die Expression des Histons H3 in NIH/3T3-Zellen. ....	89
Abbildung 31:	Die Vorbestrahlung mit nahem Infrarot A führt zu einer deutlichen Erhöhung des durch ionisierende Strahlung induzierten pKAP1-Levels. ....	90



Abbildung 32:	Sowohl die Bestrahlung mit nahem Infrarot als auch die Bestrahlung mit 10 Gy führen in NIH/3T3-Zellen zu einer Aktivierung der Serin-Threonin-Kinase ATM, welche in den doppeltbestrahlten Zellen hingegen nahezu ausbleibt. ....91
Abbildung 33:	Sowohl NIR als auch Röntgen sowie die Kombination der beide Strahlenarten beeinflussen die Expression von PARP-1, während 15 min nach der Bestrahlung mit 10 Gy das Level in den ausschließlich mit Röntgen bestrahlten NIH/3T3 höher ist als in den doppelbestrahlten, dreht sich dieser Effekt 8 h nach der Bestrahlung um. ....92
Abbildung 34:	RT-PCR-Analysen des <i>foxm1</i> -Transkriptes zeigen, dass 15 min nach der Bestrahlung mit 4 Gy die Expression des Genes hochreguliert ist, dieser Anstieg der Expression ist in den doppeltbestrahlten HaCaTs jedoch geringer. ....94
Abbildung 35:	4 h nach der Bestrahlung mit 4 Gy ist das Expressionslevel von <i>foxm1</i> in den doppeltbestrahlten HaCaT-Zellen noch deutlich erhöht. ....95
Abbildung 36:	Die kombinierte Bestrahlung aus NIR und 4 Gy führt 24 h nach Bestrahlung zu einer signifikant verminderten <i>foxm1</i> -Expression. ....96
Abbildung 37:	Die RT-PCR verschiedener durch FOXM1 regulierter Gene zeigt, dass die kombinierte Bestrahlung zu einer Herunterregulation der Transkription dieser Zielgene in HaCaT-Keratinocyten führt. ....97
Abbildung 38:	Die Bestrahlung mit nahem Infrarot A und 4 Gy führt 24 h nach der ionisierenden Strahlung zu einer fast vollständigen Inhibition der Transkription von <i>cenpB</i> . ....98
Abbildung 39:	Keine der Bestrahlungsarten zeigt 24 h nach der ionisierenden Bestrahlung einen Einfluss auf das Proteinlevel von <i>cenpB</i> in HaCaT-Keratinocyten. ....99
Abbildung 40:	Beispielbild eines PathScan® <i>Stress and Apoptosis Signaling Antibody Array</i> -Riegels. ....99
Abbildung 41:	24 h nach der Bestrahlung mit 10 Gy ist sowohl das I $\kappa$ B $\alpha$ - als auch das pI $\kappa$ B $\alpha$ -Level in den kombiniert bestrahlten NIH/3T3-Fibroblasten signifikant erhöht. ....103
Abbildung 42:	NIR erhöht tendenziell das Ca <sup>2+</sup> -Level im Zytosol von NIH/3T3-Fibroblasten, in den kombiniert bestrahlten Zellen ist dieses jedoch jeweils niedriger als in den ausschließlich mit Röntgen bestrahlten Zellen. ....105

Abbildung 43:	NIR hat in den ersten 15 min nach der Bestrahlung keinen signifikanten Einfluss auf das cAMP-Level von NIH/3T3 und HaCaT-Zellen. ....	106
Abbildung 44:	Die Vorbestrahlung mit NIR führt in NIH/3T3 zu einer oszillierenden Veränderung der intrazellulären cAMP-Konzentration. ....	107
Abbildung 45:	Die kombinierte Bestrahlung bewirkt in HaCaT-Keratinozyten zu jedem untersuchten Zeitpunkt eine Senkung des cAMP-Levels.....	108
Abbildung 46:	Keine der verwendeten Bestrahlungsmodalitäten hat einen Einfluss auf die Aktivität der <i>Superoxid Dismutase</i> . ....	110
Abbildung 47:	Die Bestrahlung mit wIRA führt dosisabhängig zu einer biphasischen Veränderung der BrdU-Aufnahmerate. ....	112
Abbildung 48:	Die Bestrahlung mit 360 kJ/m <sup>2</sup> wIRA wirkt der durch Röntgenbestrahlung verursachten Proliferationshemmung entgegen. ....	114
Abbildung 49:	360 kJ/m <sup>2</sup> wIRA verursachen einen signifikanten Anstieg des endogenen ROS-Levels. ....	115
Abbildung 50:	Die Vorbestrahlung mit wIRA führt in HaCaTs zu einem erhöhten Anstieg <i>Reaktiver Sauerstoffspezies</i> nach ionisierender Strahlung. ....	116
Abbildung 51:	NIR wirkt sowohl in den basalen Keratinozyten der Maushaut als auch im humanen Epidermismodell proliferationsfördernd. ....	151

---

## Tabellenverzeichnis

---

<b>Tabelle 1:</b> Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der PathScan® <i>Stress and Apoptosis-Analyse</i> von NIH/3T3-Fibroblasten 4 h nach der Bestrahlung mit 4 Gy .....	101
<b>Tabelle 2:</b> Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der PathScan® <i>Stress and Apoptosis-Analyse</i> von NIH/3T3-Fibroblasten 24 h nach der Bestrahlung mit 10 Gy .....	102
<b>Tabelle 3:</b> Etablierung eines humanen Vollhautmodells für strahlenbiologische Fragestellungen ....	117
<b>Tabelle 4:</b> Einfluss naher Infrarotstrahlung auf die röntgeninduzierte Schadensantwort in FTSM ...	118
<b>Tabelle 5:</b> Molekulare Mechanismen.....	119
<b>Tabelle 6:</b> wIRA und NIR im Vergleich.....	120

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

Abkürzung	Bedeutung
ALI	<i>Air-Liquid-Interphase</i>
ASP	(A)(S)corbyl-2-(P)hosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaare
BrdU	Brom-Desoxyuridin (5-Brom-2'-desoxyuridin)
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementär-DNA ( <i>complemetary DNA</i> )
Cy3	Carbocyanin 3
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCFDA	2',7'-Dichlorofluorescein Diacetat
DEPC-H <sub>2</sub> O	Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleosidacid</i> )
dNTP	Desoxy-Nukleotide-Triphosphat
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
EC	Euchromatin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FTSM	Vollhautmodell ( <i>Full Thickness Skin Model</i> )
fwd	<i>forward</i>
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gy	Gray (Einheit der Strahlendosis)
HC	Heterochromatin

HR	Homologe Rekombination
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
K	Lysin
LLL(L)T	<i>Low Level Laser (Light) Therapy</i>
MC	Mitotische Katastrophe ( <i>mitotic catastrophe</i> )
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NEAA	<i>Non Essencial Amino Acid</i>
NHEJ	<i>Non Homologous End Joining</i>
NIR	nahes Infrarot
OT	Objektträger
p	Postnatal
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chainreaction</i> )
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleosidacid</i> )
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
rpm	Rotationen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SOD	Superoxid Dismutase
SSB	DNA-Einzelstrangbruch ( <i>DNA single-strand break</i> )
ssDNA	einzelsträngige DNA ( <i>single stranded DNA</i> )
TAE	Tris-Acetat-EDTA
U	Unit
UV	Ultraviolett
vs.	versus
wIRA	wassergefiltertes Infrarot A

---

## 1. Zusammenfassung

---

Sowohl Röntgen- als auch Infrarotbestrahlung ist Bestandteil des therapeutischen Spektrums der Onkologie [1]. Röntgenstrahlung wird hierbei kurativ zur Reduktion malignen Gewebes eingesetzt [2], nahes Infrarot eher palliativ zur Linderung von Schmerzen und zur Verbesserung der Wundheilung nach einem operativen Eingriff [3-5]. Darüber hinaus ist der Wellenlängenbereich des nahen Infrarots Teil der natürlichen solaren Strahlung. Im Zuge einer Krebstherapie ist eine kombinierte Applikation der beiden Strahlenarten somit sehr wahrscheinlich. Eine Reihe verschiedener Studien aus den frühen 50er Jahren belegen, dass eine solche Doppelbestrahlung zu einer Destabilisierung der genomischen Integrität in *Tradescantia* und *Drosophila melanogaster* führt [6-10]. 2012 zeigten *Heseli et al.*, dass wassergefiltertes nahes Infrarot (NIR, 0,6-1,4  $\mu\text{m}$ ) auch in humanen und murinen Monolayerzellkulturen die röntgeninduzierte Stressantwort maßgeblich verändert [11]. Käme es bei Patienten zu einer solchen Wechselwirkung der beiden Strahlenarten, könnte dies den Behandlungserfolg einer Tumorthherapie entscheidend beeinflussen. Vor diesem Hintergrund war das Ziel dieser Arbeit, die Auswirkung der kombinierten Bestrahlung auf Zellen im Gewebeverbund zu untersuchen sowie die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Wechselwirkung näher zu charakterisieren. Hierfür wurden, basierend auf *Heseli et al.*, für beide Strahlenqualitäten therapierelevante Bestrahlungsparameter gewählt. Da beide Strahlentypen alle Schichten der Haut durchdringen, wurde für die Untersuchung der Übertragbarkeit ein humanes *in vitro*-Hautmodell (FTSM) etabliert. Die Fähigkeit der integrierten Zellen zur Markierung und Reparatur von röntgeninduzierten DSBs wurde vorab mit Hilfe der 53BP1-Foci Analyse nachgewiesen. Für die Mechanismusaufklärung wurden analog zu *Heseli et al.* murine NIH/3T3-Fibroblasten sowie humane HaCaT-Keratinocyten verwendet.

Die Untersuchung der kombiniert bestrahlten FTSM bewies klar, dass eine Vorbestrahlung mit NIR auch in Zellen im Gewebeverbund (FTSM) Auswirkungen auf die röntgeninduzierte Stressantwort hat. So zeigte sich unter anderem ein hemmender Einfluss auf die Anzahl initial markierter DSBs, sowie eine erhöhte Persistenz unreparierter DSBs in den kombiniert bestrahlten FTSM. Des Weiteren wurde ein deutlich inhibitorischer Einfluss der NIR-Vorbestrahlung auf die Entstehung röntgeninduzierter Apoptosen im dermalen Teil des FTSM gefunden. Vergleichbar mit Zellen in der Monolayerkultur wirkt NIR auch im FTSM der röntgeninduzierten Hemmung der Proliferation signifikant entgegen [11]. Die Untersuchung des Proliferationsmarkers Ki-67 verdeutlicht, dass dieser Effekt nicht mit einer erhöhten Anzahl proliferationsfähiger Zellen zusammenhängt, sondern eine NIR-Vorbestrahlung wahrscheinlich zu einer Beschleunigung des Zellzyklus führt.

Schwerpunkte der Mechanismusaufklärung waren die verzögerte Reparatur von DSBs, die erhöhte genomische Instabilität sowie der metabolische Zustand der kombiniert bestrahlten Zellen. Im

---

Zusammenhang mit der erhöhten Persistenz von DSBs in kombiniert bestrahlten NIH/3T3-Fibroblasten wurden die Heterochromatin-assoziierten Faktoren H3K9me3, KAP1 und ATM näher untersucht. Die hierbei gefundenen Effekte der vorgeschalteten NIR-Bestrahlung lassen den Schluss zu, dass die verzögerte Reparatur von DSBs in kombiniert bestrahlten Zellen mit der Modifikation der Chromatinverteilung einhergeht [12-14]. Im Zuge von Untersuchungen verschiedener Faktoren, deren Beteiligung an der Entstehung mitotischer Katastrophen beschrieben ist, wurde der Transkriptionsfaktor FOXM1 als möglicher Verursacher für die durch NIR induzierte erhöhte genomische Instabilität gefunden [6-11]. In den kombiniert bestrahlten Zellen konnte sowohl eine gehemmte Transkription von FOXM1 als auch die einer Reihe FOXM1-nachgeschalteter Gene nachgewiesen werden. Analysen des zellulären Metabolismus zeigten zwar keinen signifikanten Einfluss der kombinierten Bestrahlung auf die Sekundärmetabolite  $\text{Ca}^{2+}$  und cAMP, im Hinblick auf den von *Heslich et al.* beschriebenen Anstieg *Reaktiver Sauerstoffspezies* konnte jedoch bewiesen werden, dass dieser nicht durch eine Störung der *Superoxid Dismutase* verursacht wird [11]. Darüber hinaus konnte eine erhöhte Phosphorylierung des NFκB-Inhibitors IκBα nachgewiesen werden, was auf eine Aktivierung des redox-sensitiven NFκB-Signalweges in den kombiniert bestrahlten Zellen schließen lässt [15, 16].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier nachgewiesene Relevanz der von *Heslich et al.* gezeigten Effekte in der humanen Gewebekultur bestätigt, dass die unbedachte Bestrahlung von Patienten mit NIR und Röntgenstrahlen ein nicht zu unterschätzendes Risiko birgt. Andererseits könnte die Verschlechterung der DNA-Reparaturkapazität, sowie die Herunterregulation von FOXM1 durch die kombinierte Bestrahlung dabei helfen, bestimmte Tumore durch das Vorschalten einer NIR-Bestrahlung schneller zu bekämpfen.

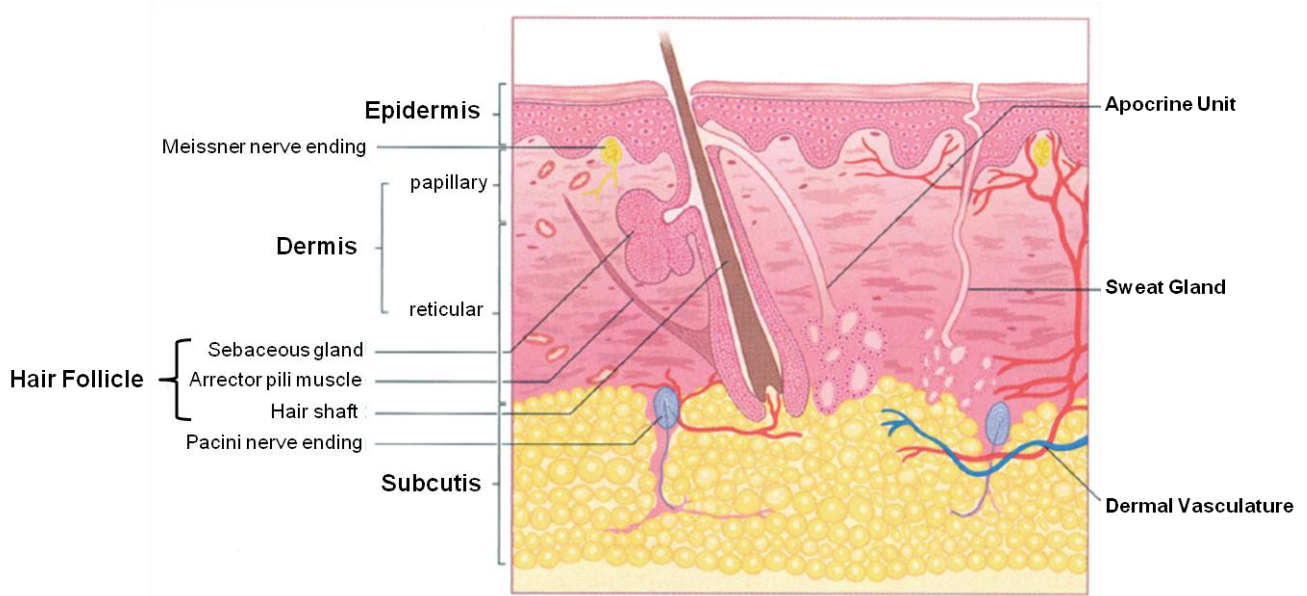
---

## 2. Einleitung

---

### 2.1. Die Haut – Funktion und Aufbau

Die Haut als größtes Organ des Menschen, bei einem Erwachsenen mit einer Fläche von ca. 1,2-2,3 m<sup>2</sup>, ist jeden Tag vielen verschiedenen Umwelteinflüssen ausgesetzt. Neben mechanischen, chemischen und infektiösen Reizen wirken täglich auch die verschiedensten physikalischen Einflüsse, wie beispielsweise die Sonneneinstrahlung, auf die Haut. Zu den Aufgaben der Haut gehört es daher unter anderem, die inneren Organe des Menschen gegen diese exogenen Reize zu schützen. Des Weiteren nimmt dieses Hüllorgan wichtige Aufgaben bei der Temperaturregulation, der Homöostase, im Stoffwechsel sowie in der Immunantwort des Körpers ein [17-19]. Gegliedert ist die Haut in drei Schichten [20], proximal liegt die Subkutis, gefolgt von der Dermis, distal schließt die Epidermis die Haut nach außen hin ab (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Schematischer Querschnitt der Haut.**

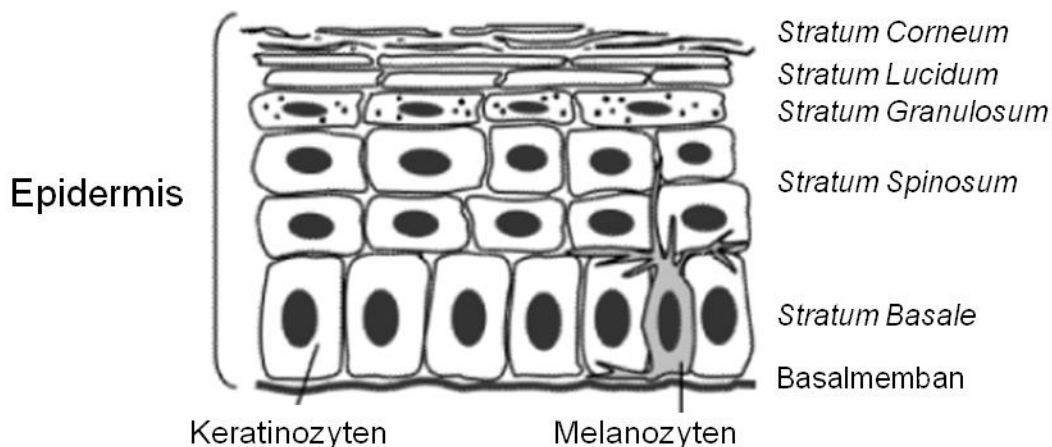
Dargestellt sind die drei Schichten Subkutis, Dermis und Epidermis sowie der schematische Aufbau eines Haarfollikels. Die Hauptgefäße zur Blutversorgung der Haut haben ihren Ursprung in der Subkutis, verzweigen sich jedoch in kleinen Kapillaren bis zur Grenzschicht zwischen Dermis und Epidermis. Neben den verschiedenen Drüsen (Apokrine und Schweißdrüsen) findet man in der Dermis auch Nervenendigungen, die für die Weiterleitung der verschiedenen exogenen Reize verantwortlich sind. Quelle: Andrews' Diseases of the Skin: Clinical Dermatology (10th ed., p. 1), by W.D. James, T.G. Berger, and D.M. Elston, 2006, Philadelphia: Elsevier Saunders. Copyright 2006 by Elsevier Saunders. *modifiziert*

Die Subkutis, bestehend aus losen Bindegewebsfasern und Fettzellen, dient als Isolationsschicht und Energiespeicher [20]. In dieser Schicht verlaufen Nervenbahnen sowie große Blutgefäße, die zur Versorgung aller Hautschichten als kleinere Kapillaren in die oberhalb liegende Dermis verzweigen.



---

Die Dermis, auch Lederhaut genannt, besteht aus reißfesten Kollagen- sowie sehr flexiblen Elastin- und Fibrillinfasern [21], deren molekulare Struktur die Elastizität der Haut gewährleistet. Des Weiteren findet man in der *Extrazellulären Matrix* (ECM) dieser Hautschicht Fibronektine und Proteoglykane [18]. Auf diesem Proteingerüst können sich die verschiedenen Zelltypen der Dermis frei bewegen, wobei die spezifische ECM ihnen als Untergrund für ihre Migration dient. Zu den Zelltypen der Dermis gehören vornehmlich Fibroblasten, die vor allem für die *de Novo*-Synthese dieser ECM-bildenden Proteine verantwortlich sind [18]. Neben diesen ECM-Produzenten findet man in der Dermis aber auch Makrophagen, Lymphozyten und Mastzellen [21]. Strukturell gliedert sich die Dermis in zwei Strata. Das der Subkutis aufliegende *Stratum Reticulare* ist von Kapillaren durchzogen und besteht hauptsächlich aus ECM. Im *Stratum Papillare*, der dünneren der beiden Schichten, befindet sich der Hauptteil der dermalen Zellen. Gekennzeichnet ist das *Stratum Papillare* durch den namensgebenden Papillarkörper, dessen wellblechartige Struktur zu einer festen mechanischen Verbindung zwischen Epidermis und Dermis führt. Durch die große Oberfläche, die sich aus den Papillen an dieser Grenzschicht ergibt, sind Epidermis und Dermis fest miteinander verzahnt. Die Architektur des Papillarkörpers führt nebenbei auch zu einer erleichterten Abgabe von Nährstoffen aus den Kapillaren der Dermis an die epidermalen Zellen, welche, da die Epidermis selbst über keine eigenen Blutgefäße verfügt, nur aus dieser Schicht versorgt werden können. Neben der festen Verbindung von Subkutis und Epidermis ist die Dermis jedoch auch Ursprung von Hautdrüsen und Haarfollikeln. Des Weiteren finden sich im *Stratum Papillare* Temperaturrezeptoren, sowie Rezeptoren, die der Wahrnehmung mechanischer Reize dienen. Diese Sinnesrezeptoren liegen über freien Nervenendigungen, wodurch die Weiterleitung von exogenen Signalen an das Nervensystem gewährleistet wird. Epidermis und Dermis werden optisch sehr deutlich durch die sogenannte Basalmembran voneinander getrennt [18]. Diese spezielle Membranstruktur verankert die lose ECM der Dermis fest mit der direkt aufliegenden Basalzellschicht der Epidermis (*Stratum Basale*) [18].



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Epidermis.**

Die distal gelegene Epidermis gliedert sich an den meisten Körperstellen in vier Schichten. Das *Stratum Basale*, die innerste Zellschicht, ist der Ort der Regeneration der äußersten Hautschicht. Hier befinden sich vor allem die teilungsfähigen basalen Keratinozyten. Neben diesen findet man aber auch Melanozyten, die zum Schutz vor UV-Strahlung über Fortsätze Melanosomen an die benachbarten Keratinozyten abgeben. Nach Abschluss ihres letzten Zellzyklus in der Basalzellschicht, beginnt für die Keratinozyten die terminale Differenzierung. Auf dem Weg an die Oberfläche der Epidermis beginnt im *Stratum Spinosum* die Keratinisierung, die mit dem Abbau der Zellorganellen einhergeht. Im *Stratum Granulosum* lagern die Zellen Keratingranula im Zytoplasma ein, was zur endgültigen Verhornung führt. In dieser Schicht wird auch der vollständige Abbau des Zellkerns abgeschlossen. Die nun gänzlich verhornten Korneozyten bilden das *Stratum Corneum*, die eigentliche Schutzhülle des Körpers. In manchen Körperregionen, wie beispielsweise den Füßen, ist das *Stratum Corneum* durch das sogenannte *Stratum Lucidum* verstärkt. Bei dieser zusätzlichen epidermalen Schicht handelt es sich um Korneozyten, die durch das Einlagern besonders ölig, azidophiler Keratohyalin granula verstärkt das Eindringen von Bakterien verhindern. Quelle: modifiziert nach [18]

Das *Stratum Basale* ist das Innerste der vier Strata der Epidermis, das morphologisch sehr deutlich durch die dichtgepackte einschichtige Anordnung kubischer Zellen erkennbar ist (Abbildung 2). In dieser Zellschicht befinden sich vor allem die teilungsfähigen Keratinozyten, weshalb diese Schicht besonders wichtig für die Regeneration der obersten Hautschicht ist. Die Zellteilung der Keratinozyten verläuft asymmetrisch, d.h. eine Tochterzelle verbleibt in der Basalschicht der Epidermis und behält ihren Stammzellcharakter, während die andere, eine sogenannte Amplifikationszelle, noch weiter 4-5 mal den Zellzyklus durchläuft, bevor sie ihren Weg an die Oberfläche der Epidermis und somit ihre terminale Differenzierung beginnt [19, 22]. Nach ihrer letzten Zellteilung wird die Zelle in die nächste Schicht, die sogenannte Stachelzellschicht (*Stratum Spinosum*) abgegeben. Die Keratinozyten des *Stratum Spinosums* sind über Zytoplasmaausläufe, die Desmosomen, miteinander verbunden, was ihnen das für diese Schicht charakteristische stachelige Aussehen verleiht. In dieser Schicht beginnt nun die Keratinisierung der Zellen. Dieser auch als Verhornung bezeichnete Prozess führt dazu, dass sowohl die Zellkerne als auch die anderen Zellorganellen der Keratinozyten abgebaut und Keratin in großen Mengen eingelagert wird [18]. Die Zellen aus dem *Stratum Spinosum* wandern anschließend

---

weiter nach oben und wandeln sich im *Stratum Granulosum* in leblose Korneozyten um. Das *Stratum Granulosum* ist somit der Ort umfangreicher Differenzierungsvorgänge sowie der endgültigen Apoptose. Die Zellen platten ab und fangen an Keratingranula im Zytoplasma einzulagern [18]. An diese Schicht grenzt das *Stratum Corneum*, die endgültige Hornschicht, bestehend aus 12-200 Zelllagen vollständig verhornter Korneozyten [19]. Diese Zellen besitzen keinerlei Zellorganellen mehr, sondern bestehen nur noch aus einem Keratingerüst, das zum Schutz des Körpers gegen exogene Einflüsse dient. Zwischen den Zellen befinden sich Lipide, die zusätzlich für die wasserabweisende Eigenschaft des *Stratum Corneums* sorgen. Nach Abschluss der Differenzierung zu vollständig ausdifferenzierten Korneozyten werden diese im Verlauf der Zeit aus dem *Stratum Corneum* abgestoßen und aus den unteren Schichten der Epidermis durch neue ersetzt. Um die gesunde Struktur der Epidermis zu erhalten, muss somit das Verhältnis der proliferierenden Keratinozyten im *Stratum Basale* mit dem der abgestoßenen Korneozyten in der äußersten Hautschicht perfekt übereinstimmen [23]. In bestimmten Bereichen des Körpers, wie der Leistenhaut an Händen und Füßen, die besonders starker mechanischer Belastung ausgesetzt sind, findet man zwischen *Stratum Granulosum* und *Stratum Corneum* eine weitere Zellschicht, das *Stratum Lucidum*. Dieses Stratum besteht aus einer öligen, azidophilen Keratohyalingranulaschicht mit sehr einheitlich aussehenden Korneozyten und dient als besonders dichte Barriere gegen mikrobielle Eindringlinge.

Neben den Keratinozyten, die etwa 80% der Epidermis ausmachen [18], findet man noch weitere Zelltypen in den verschiedenen Strata dieser Hautschicht [21]. In der basalen Zellschicht der Epidermis befinden sich z.B. nach einem definierten Muster verteilt Melanozyten (Abbildung 2) [24]. Diese Melanin synthetisierenden Zellen sind für den Schutz der epidermalen Zellen gegenüber UV-Strahlung verantwortlich. Über Zellfortsätze aus dem *Stratum Basale* bis hinein in das *Stratum Spinosum* ist ein Melanozyt mit ca. 36 Keratinozyten verbunden [24]. Über diesen Weg geben die Melanozyten Melanosome an die Keratinozyten ab, welche dann in den Empfängerzellen rund um deren Zellkern angeordnet werden und diesen so gegen das Eindringen von UV-Strahlung schützen [25]. Ebenfalls im *Stratum Basale* findet man die Merkel-Zellen. Diese Zellen liegen direkt über freien Nervenenden aus der Dermis und dienen als Mechanosensoren [20]. Etwa 2-8% der epidermalen Zellen, die sogenannten Langerhans-Zellen, sind für die Immunabwehr der Haut verantwortlich [26]. Diese aus dem Knochenmark stammenden dendritischen Zellen liegen vorwiegend im *Stratum Spinosum* und aktivieren im Falle eines Fremdeindringens T-Helferzellen für die Immunreaktion.

---

## 2.2. Hautmodelle – Alternative zur klassischen Zellkultur

Da die Haut als Schutzbarriere des Körpers ständig verschiedensten Umwelteinflüssen ausgesetzt ist, ist es von großer Bedeutung zu erforschen, wie sich diese auf die Zellen der Haut auswirken. Der modernen Forschung stehen hierzu verschiedene Herangehensweisen zur Verfügung. Die klassische Methode ist die sogenannte Monolayerzellkultur. Dermale bzw. epidermale Zellen werden hierbei in Zellkulturgefäße gesät und bilden unter den entsprechenden Kulturbedingungen einen fest am Boden des Kulturgefäßes adhärierten 2D-Zellrasen. Für diese Art der Kultivierung eignen sich sowohl Zelllinien als auch primäre Spenderzellen.

Vergleicht man jedoch die histotypische Umgebung von Hautzellen mit der von Zellen in der zweidimensionalen Zellkultur, wird schnell klar, dass diese Art der Kultur aus verschiedenen Gründen lediglich einen ersten Eindruck über die Reaktion von Zellen auf eine Behandlung geben kann. Durch die dreidimensionale Anordnung ist eine Zelle im Gewebe von allen Seiten von Nachbarzellen umgeben, wodurch sich unter anderem eine völlig andere Zell-Zellkommunikation ergibt. Auch ist das Substrat, auf dem die Zellen in der klassischen Zellkultur wachsen, starr und unbeweglich, während Zellen im Gewebeverbund im Regelfall auf beweglichem Untergrund adhärieren, bzw. sich auf diesem durch Migration in alle Richtungen bewegen können. Abgesehen von den direkt benachbarten Zellen besteht dieser Untergrund aus verschiedenen gewebespezifischen Matrixproteinen, die zusammen die sogenannte *Extrazelluläre Matrix* (ECM) bilden. An die ECM-bildenden Proteinen gebunden, beeinflussen auch verschiedene Wachstumsfaktoren, Enzyme und andere diffusionsfähige Moleküle das Verhalten der Zellen in ihrem jeweiligen Mikroumfeld maßgeblich [18].

Die Unterschiede, die sich aus den verschiedenen Wachstumsbedingungen in der Monolayerkultur im Vergleich zur *in vivo*-Situation ergeben, manifestieren sich auf verschiedenen Ebenen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das Expressionsmuster einzelner Gene in der Monolayerzellkultur, verglichen mit dem von Zellen im histotypischen Umfeld, stark variiert [27]. Ebenso konnte ein Einfluss der Kulturbedingungen auf die Morphologie von Zellen beobachtet werden. Fibroblasten in der 2D-Kultur weisen ein einheitlich flaches Aussehen auf, welches sie *in vivo* jedoch nicht zeigen [28]. Betrachtet man den Aufbau der Haut genauer, wird deutlich, dass neben den oben genannten noch weitere, sehr wichtige Unterschiede zwischen der klassischen Zellkultur und den Zellen im Gewebeverbund bestehen. Wird in der Monolayerzellkultur in der Regel nur ein einziger Zelltyp kultiviert, wird ein Organ hingegen aus vielen verschiedenen Zelltypen gebildet, die sich im Gewebe über Zell-Zellkommunikation gegenseitig beeinflussen. Ein Beispiel hierfür ist die epidermale-dermale Interaktion, bei der die dermalen Zellen parakrin wirkende Faktoren, wie KGF (*Keratinocyte Growth Factor*), produzieren, welche dann Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten in der Epidermis beeinflussen [29]. Da sich jeder dieser Zelltypen von den anderen durch sein spezifisches

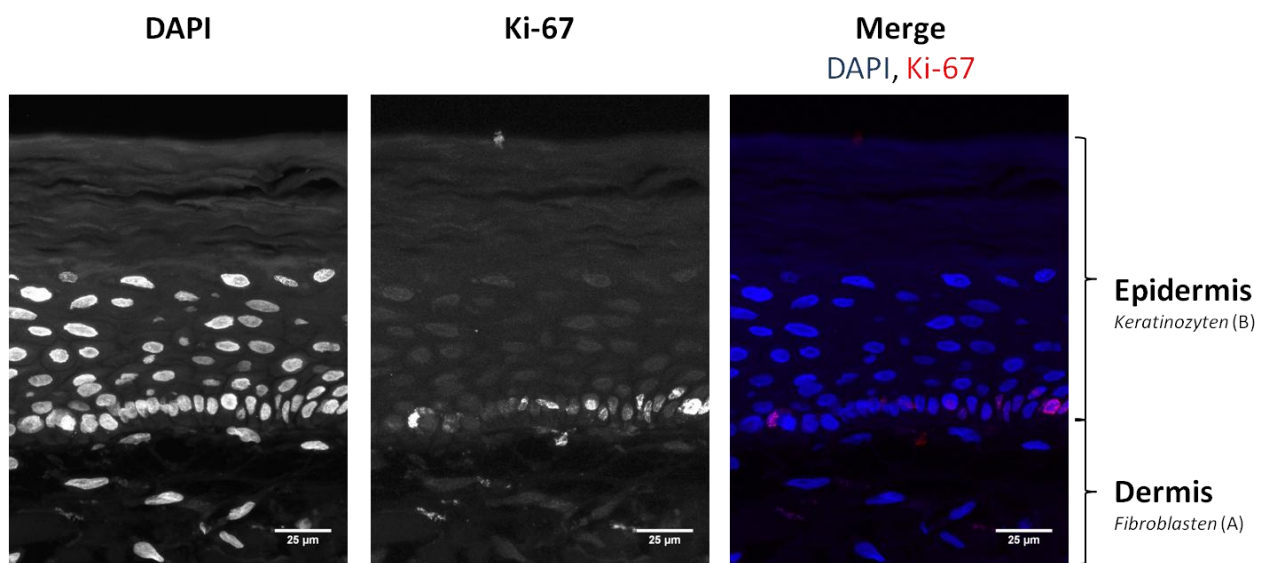
---

Proteom unterscheidet, können die verschiedenen Zellarten sehr unterschiedlich auf dieselbe Behandlung reagieren [30, 31], was wiederum dazu führen kann, dass durch das Freisetzen zelltypspezifischer Botenstoffe das Verhalten eines anderen Zelltyps nach der Behandlung ebenfalls moduliert wird. Dies macht deutlich, dass in einer Zellkultur, die zu meist nur einen Zelltyp beinhaltet, die Reaktion auf eine Behandlung völlig anders verlaufen kann, als dies im histotypischen Umfeld der Fall wäre. Um dieses Problem zu umgehen, arbeiten Forscher in den letzten Jahren immer häufiger mit so genannten organotypischen Zellkulturen. Im Falle dermatologischer Fragestellungen gibt es beispielsweise seit einigen Jahren verschiedene sogenannte Vollhautmodelle (*Full Thickness Skin Models*/FTSM) käuflich zu erwerben (z.B. von der Firma MatTek, Ashland, USA oder Henkel, Düsseldorf, Deutschland). Da diese jedoch meist sehr teuer sind, wurden verschiedene Protokolle entwickelt, mit deren Hilfe im eigenen Labor Vollhautmodelle kultiviert werden können. Als Basis dienen hierbei verschiedene Proteinmatrices, deren Hauptbestandteil Kollagen ist. Im Zuge dieser Arbeit wurde beispielsweise MatriDerm® (MedSkin Solutions Dr. Suwelack AG, Billerbeck, Deutschland), eine kommerziell erhältliche Wundauflage, bestehend aus Kollagen und Elastin, als Grundlage für die Kultivierung der FTSM verwendet [32]. Zu Beginn der Kultivierung eines solchen *in vitro*-Hautmodells werden primäre Fibroblasten in eine derartige Proteinmatrix eingebettet. Im nächsten Kulturschritt werden ebenfalls primäre Keratinozyten auf diese Matrix aufgebracht. Nach einiger Zeit unter submersen Kulturbedingungen, wird die Kultur an die Medienoberfläche gehoben, sodass die Keratinozyten mit der Luft in Kontakt kommen (Abbildung 13). Durch dieses Signal wird die terminale Differenzierung der Keratinozyten induziert, es bildet sich eine vollständige Epidermis mit allen vier Schichten aus.

Neben der Kommunikation verschiedener Zelltypen kommt in einem Gewebeverbund noch ein weiterer wichtiger Faktor bei der Beurteilung der Auswirkung einer Behandlung zum Tragen, nämlich die Differenzierung von Zellen und die damit einhergehende Einschränkung der Proliferation. In der klassischen Zellkultur werden hauptsächlich Zellen verwendet, die z.B. durch die Behandlung mit einem Virus immortalisiert wurden [33], wodurch sie uneingeschränkt teilungsfähig sind und so über lange Zeit kultiviert werden können. Außerdem bleiben sie in ihrem Differenzierungszustand sehr homogen. In der Epidermis hingegen sind schon im *Stratum Basale* überhaupt nur etwa 20-40% der Keratinozyten positiv für den Proliferationsmarker Ki-67, des Weiteren findet man Keratinozyten in jedem Differenzierungsstadium. Die oberste Zellschicht besteht sogar aus toten Zellen, die dem Schutz der tiefer liegenden Zellen dienen. Mit der Differenzierung der Zellen im Gewebe geht auch eine veränderte Genexpression einher, die ebenfalls zu einer Veränderung der Antwort von Zellen auf äußere Reize führen kann. Auch kann die unterschiedliche Expression von parakrinen Faktoren je nach

Differenzierungsgrad wiederum benachbarte, undifferenzierte Zellen in Folge eines exogenen Signals beeinflussen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Hautmodelle beinhalten nicht nur die zwei Hauptzelltypen (Fibroblasten und Keratinozyten), sondern auch die verschiedenen Differenzierungsstadien, welche die Haut ausmachen. Das einschichtige *Stratum Basale* beherbergt auch in diesen organotypischen Kulturen die für die Regeneration der Epidermis wichtigen Ki-67 positiven Keratinozyten und durch die terminale Differenzierung dieser Zellen werden alle Schichten der Epidermis gebildet (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Querschnitt eines auf MatriDerm® basierenden Vollhautmodells (FTSM).**

Im Bereich der Dermis (A) finden sich verstreut liegende Fibroblasten mit länglichem Zellkern. Deutlich zu erkennen ist das direkt aufliegende *Stratum Basale*. Die Kernmorphologie der Keratinozyten unterscheidet sich hier durch die palisadenartige Struktur deutlich von der der Fibroblasten sowie von der der Keratinozyten in den oberen Schichten. Der immunhistochemische Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67 zeigt, dass auch in den hier verwendeten FTSM nur in der unteren, für die Regeneration der Epidermis verantwortlichen, einschichtigen Basalzellschicht proliferationsfähige Zellen lokalisiert sind. Auf dem Weg an die Oberfläche verändert sich die Form der Kerne deutlich, bis sie im *Stratum Corneum* komplett abgebaut sind. Obwohl diese epidermale Schicht keine Zellkerne mehr enthält, ist sie über die Eigenfluoreszenz der Korneozyten deutlich zu erkennen (wellige Struktur am oberen Rand des Bildes). Durch die Ausbildung dieser äußersten Schicht der Epidermis in den hier verwendeten FTSM kann man erkennen, dass die integrierten humanen Spenderkeratinozyten die für diese Hautschicht typische terminale Differenzierung vollständig durchlaufen und sich somit als *in vitro*-Kultur zur Untersuchung verschiedener Behandlungen durch die Vergleichbarkeit mit dem *in vivo*-Zustand sehr gut eignen.

Neben den oben genannten Vorzügen für die Beurteilung der Wirkung verschiedener Behandlungen in der Grundlagenforschung hat der Einsatz solcher *in vitro*-Gewebekulturen, wie die hier verwendeten FTSM, einen weiteren sehr wichtigen Vorteil: den Ersatz von Tierversuchen. Sah das bisherige Verfahren bei der Zulassung einer Behandlung im ersten Schritt Versuche mit Zellen im Monolayer

---

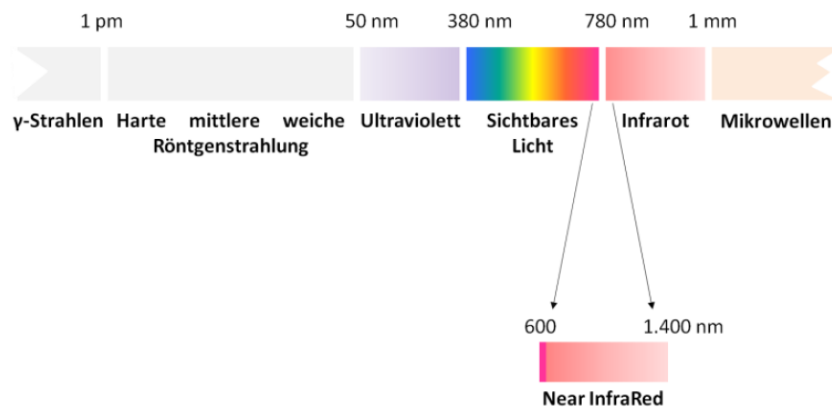
und im nächsten Schritt direkt den Tierversuch vor, kann durch die Verwendung solcher alternativer Zellkulturen ein Zwischenschritt eingeführt werden, der zur Minimierung der Anzahl der benötigten Tiere beitragen kann. Auch in der strahlenbiologischen Forschung wird die Frage nach der Übertragbarkeit der im Monolayer erbrachten Ergebnisse auf den Menschen immer lauter. Mit Hilfe organotypischer Zellkulturen könnten auch in diesem Forschungsfeld viele offene Fragen beantwortet werden.

## **2.3. Strahlung**

### **2.3.1. Nahes Infrarot (NIR)**

Der um 1800 von Friedrich W. Herschel entdeckte Wellenlängenbereich des Infrarots grenzt im elektromagnetischen Spektrum direkt an den Rotanteil des sichtbaren Lichts und geht über in den Bereich der langwelligen Mikrowellenstrahlung (0,78-1000  $\mu\text{m}$ , Abbildung 4). Anhand seiner physikalischen Eigenschaften ist der Bereich der Infrarotstrahlung in drei Teilbereiche gegliedert. Der Bereich zwischen 0,78 bis 3  $\mu\text{m}$  wird sprachlich als nahes Infrarot definiert. Die mittlere Infrarotstrahlung beinhaltet die Wellenlängen zwischen 3 bis 50  $\mu\text{m}$  und der Bereich des fernen Infrarots umschließt den Wellenlängenbereich zwischen 50  $\mu\text{m}$  bis 1 mm. Der nahe Infrarotbereich wird noch einmal in Infrarot A (0,78-1,4  $\mu\text{m}$ ) und Infrarot B (1,4-3  $\mu\text{m}$ ) unterteilt, wobei sich diese zusätzliche Unterteilung daraus ergibt, dass ab ca. 1,45  $\mu\text{m}$  die Absorption der Strahlung in Wasser stark zunimmt. Mit dieser verstärkten Absorption der Wellenlängen in Wasser steigt auch die Wärmeinduktion in wasserhaltiger Materie sowie im Gewebe. Die Bereiche der mittleren und der fernen Infrarotstrahlung sind in dieser Einteilung unter dem Begriff Infrarot C zusammengefasst (3-1000  $\mu\text{m}$ ).





**Abbildung 4: Elektromagnetisches Spektrum.**

Beginnend mit den kurzwelligen, energiereichen Wellenlängen der  $\gamma$ -, Röntgen- und UV-Strahlung geht das Spektrum bei 380 nm in den Bereich des sichtbaren Lichts über. Dieser erstreckt sich bis zu 780 nm, gefolgt vom längerwelligen Infrarot, an das sich im Folgenden die Mikrowellenstrahlung anschließt. Im Zuge dieser Arbeit wurde mit Wellenlängen des nicht-thermischen nahen Infrarots von 600-1.400 nm bestrahlt (Near InfraRed, NIR). Dieses Bestrahlungsspektrum schließt zusätzlich einen kleinen Teil des sichtbaren Lichts mit ein. Quelle: [34]

Verschiedene medizinische Infrarot Anwendungen profitieren davon, dass Infrarot A-Wellen tief ins Gewebe eindringen und dort einen mehrfachen Energieeintrag erzielen können, ohne dabei durch Wechselwirkungen mit den Wassermolekülen der oberen Hautschichten diese thermal zu belasten [4]. Die Bestrahlung mit Infrarot A wird im medizinischen Umfeld meist um einen geringen Anteil des sichtbaren roten Lichts ergänzt, woraus sich ein Spektrum zwischen 0,6 – 1,4  $\mu\text{m}$  ergibt (Abbildung 4, Near InfraRed, NIR). Um diesen Bereich applizieren zu können, wird das Spektrum einer Halogenlampe durch zwei Filter eingeschränkt. Die sichtbaren Wellenlängen unterhalb von 0,6  $\mu\text{m}$  werden durch das Vorschalten eines Sperrfilters herausgefiltert. Durch einen ebenfalls vorgeschalteten Wasserfilter werden alle Wellenlängen oberhalb von 1,4  $\mu\text{m}$  über Absorption zurückgehalten. Ebenfalls medizinische Anwendung findet die sogenannte LLL(L)T (Low Level Light (Laser) Therapy). Bei diesem Therapieansatz wird kein breitbandiges Spektrum eingesetzt, sondern Laser/LED-Dioden mit einer definierten Wellenlänge vor allem aus dem NIR-Bereich, aber auch aus dem Bereich des sichtbaren Lichts. Einsatz finden diese verschiedenen Infrarot-Therapien beispielsweise zur Verbesserung der Wundheilung, Schmerzlinderung sowie zur Behandlung von *Verrucae* (Warze) [3-5, 35].

Die Wirkung der nahen Infrarotstrahlung beruht primär darauf, dass es in Zellen bestimmte Chromophore gibt, die die Wellenlängen der NIR absorbieren können und dadurch in einen angeregten Zustand versetzt werden. Chromophore des NIR-Bereichs sind typischerweise Metalle oder Moleküle, die ein Metallatom enthalten, wie beispielsweise die zu den Häm-Kupfer-Oxidasen gehörende *Cytochrom-C-Oxidase* (COX) [36]. Im aktive Zentrum dieses Enzym befinden sich eine Häm-Gruppe sowie ein Kupfer-Ion, die beide NIR-Wellenlängen absorbieren können, was zur



---

Aktivierung dieses Enzyms führen kann [37]. Als Bestandteil der Atmungskette ist die COX in der Membran der Mitochondrien lokalisiert, was dieses Zellorganell zu einem wichtigen Effektor der NIR-Bestrahlung macht. Durch die Absorption der Strahlung sowie die daraus resultierende Aktivierung der COX kommt es zu einer erhöhten oxydativen Phosphorylierungsrate und zu Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials [38, 39]. Durch diese gesteigerte Aktivität der COX entstehen in den bestrahlten Zellen auch vermehrt *Reaktive Sauerstoffspezies* (ROS) [11, 36, 40-42].

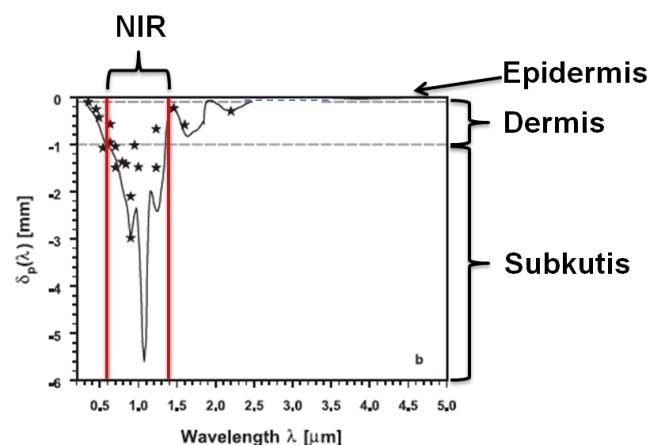
Da jedoch nach der Bestrahlung mit Licht verschiedener Wellenlängen auch Veränderungen von Molekülen ohne Chromophorcharakter beschrieben wurden, wurde die Theorie entwickelt, dass neben der Absorption der Wellenlängen auch die Induktion eines elektrischen Feldes zur Aktivierung verschiedener zellulärer Prozesse führen kann [36]. *Amat et al.* zeigten beispielsweise, dass mit 635 nm, bzw. 830 nm bestrahltes Adenosintriphosphat (ATP) eine beschleunigte Reaktionskinetik aufweist [39]. Die Forscher interpretieren diese Beobachtung so, dass die Bestrahlung mit diesen Wellenlängen zu einer Veränderung der Resonanzstruktur des Moleküls führt. Durch diese Veränderung wird den zuständigen Enzymen die energieliefernde Abspaltung der äußersten Phosphatgruppe erleichtert, wodurch die Bereitstellung der gespeicherten Energie beschleunigt ist [36]. Weitere Metabolite, auf deren Vorkommen bzw. Lokalisation die Bestrahlung mit Wellenlängen des nahen Infrarotspektrums einen Einfluss haben, sind cyclisches AMP (cAMP) und Calcium [43-46] (s. Kapitel 2.6). Während das vermehrte Vorkommen des sekundären Botenstoffes cAMP vermutlich mit der erleichterten katalytischen Spaltung von ATP in Folge der Bestrahlung mit NIR zusammenhängt, konnte bisher nicht geklärt werden, welcher Wirkmechanismus der Translokation von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem *Endoplasmatischen Retikulum* in das Innere der Mitochondrien in bestrahlten Zellen zugrunde liegt.

Alle diese Bestrahlungseffekte zusammen führen zu einem veränderten zellulären Metabolismus. Neben dem Einfluss auf den Energiestoffwechsel der Zellen konnte jedoch auch eine veränderte Genexpression durch die Bestrahlung mit 628 nm nachgewiesen werden [47]. Da im Nukleus selber bisher kein Chromophor für die Wellenlängen des nahen Infrarotspektrums gefunden wurde und alle beschriebenen Effekte mit den Mitochondrien der Zellen assoziiert sind, geht man davon aus, dass durch den Einfluss der Strahlung der sogenannte retrograd-mitochondriale Signalweg in Zellen aktiviert wird [38]. Diese Kommunikation zwischen Mitochondrien und Nukleus erlaubt es der Zelle, auf Abweichungen des mitochondrialen Stoffwechsels mit der *de novo*-Synthese von Proteinen zu reagieren, wodurch diverse Signalkaskaden aktiviert werden können [48, 49]. Über diesen Weg können die strahleninduzierten mitochondrialen Veränderungen der Zellen auch langfristige Auswirkungen auf genetischer Ebene haben [38]. Diese zeigen sich zum Beispiel durch eine veränderte

Zellproliferation [3, 11], die Expression pro- und anti-apoptotischer Proteine als Schutz vor UV-induzierter Zytotoxizität [50, 51] oder die Modifikation der Expression verschiedener Matrix-Metalloproteasen [52, 53] nach der Bestrahlung mit nahem Infrarot.

Dadurch, dass das nahe Infrarot Teil der solaren Strahlung ist, ist der Mensch ihr nahezu täglich ausgesetzt. Bereits ein 15-30-minütiger Spaziergang reicht aus, um die im Zuge dieser Arbeit verwendete Dosis zu erreichen (basierend auf dem Juni-Durchschnittswert von 1989 bis 2011: 14 min Rom, Italien; 18 min New York, USA; 24 min Frankfurt, Deutschland; 30 min Sidney, Australien; Quelle: Atmospheric Science Data Center of NASA). Auch liegt die hier verwendete Dosis im therapeutisch eingesetzten Bereich.

Besonders betroffen von Strahlen des nahen Infrarotspektrums sind die Zellen der Haut. Wie Abbildung 5 zeigt, dringen alle Wellenlängen des NIR-Spektrums bis in die Subkutis der Haut ein. Diese Eindringtiefe führt dazu, dass bei einer Bestrahlung mit NIR alle Zelltypen dieses Gewebes exponiert werden, weshalb die Untersuchung der epidermalen sowie dermalen Zellen in diesem Forschungsfeld von besonderem Interesse ist [54].



**Abbildung 5: Eindringtiefe naher Infrarotstrahlung (NIR) in die Haut.**

Alle Wellenlängen des NIR-Bereichs zwischen 0,6 – 1,4  $\mu\text{m}$  können sowohl die Epidermis als auch die Dermis vollständig durchdringen und werden erst in der Subkutis absorbiert. Dies zeigt, dass alle Zellen der oberen beiden Hautschichten von der Exposition aller NIR-Wellenlängen betroffen sind. Quelle: *modifiziert nach* [54]

### 2.3.2. Ionisierende Strahlung

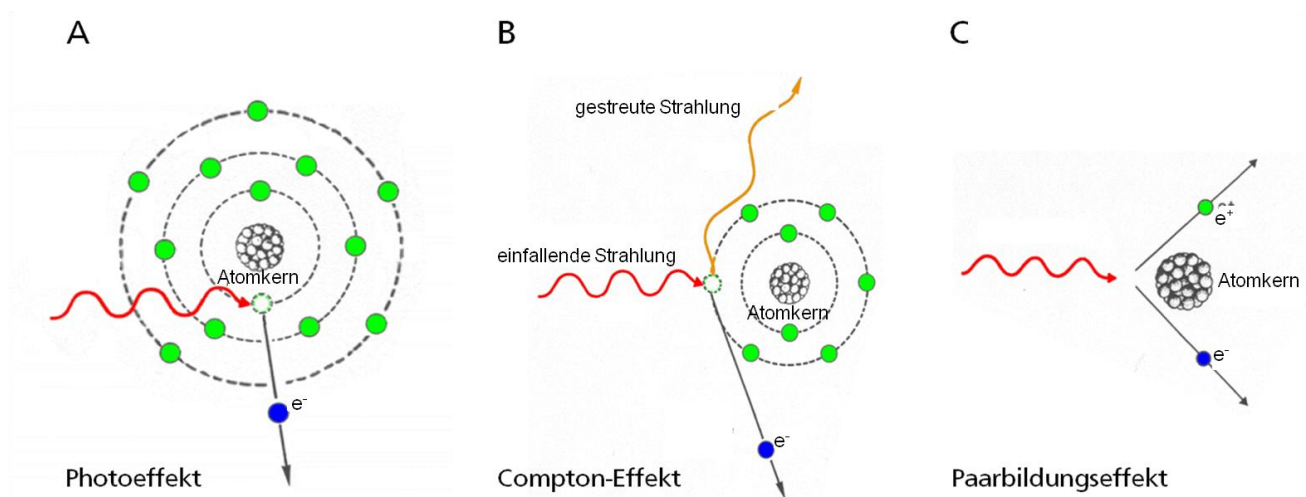
Unter dem Begriff der ionisierenden Strahlung werden alle Strahlenarten zusammengefasst, deren Energie ausreicht, um Elektronen eines Atoms bzw. Moleküls vorübergehend auf ein höheres Energieniveau zu heben (Anregung) oder sogar aus diesem herauszuschlagen (Ionisation). Unterteilt wird die ionisierende Strahlung in die dünn ionisierende elektromagnetische Strahlung (Röntgen- und

---

$\gamma$ -Strahlung) sowie die dicht ionisierende Teilchenstrahlung (Elektronen, Neutronen, Protonen und Schwerionen).

Die hier verwendete Röntgenstrahlung liegt im elektromagnetischen Spektrum zwischen der UV- und  $\gamma$ -Strahlung (50 nm- 1pm, Abbildung 4). Neben der Differenzierung über den Wellenlängenbereich unterscheiden sich  $\gamma$ - und Röntgenstrahlen auch durch die Art ihrer Entstehung, wobei erstere beim Zerfall von Elementen freigesetzt und letztere aktiv in einer Röntgenröhre erzeugt werden. Zur Erzeugung von Röntgenstrahlen wird an der Katode einer Röntgenröhre eine Hochspannung angelegt, wodurch diese Elektronen emittiert, die dann im elektrischen Feld stark beschleunigt werden. Diese beschleunigten Elektronen treffen im Folgenden auf die Metallanode (z.B. Wolfram) der Röntgenröhre, wodurch sie stark abgebremst werden. Durch diesen Prozess entstehen die sogenannte Bremsstrahlung sowie in Abhängigkeit des Anodenmaterials die charakteristische Röntgenstrahlung. Die Bremsstrahlung spiegelt hierbei diejenige Energie wider, die beim Abbremsen des Elektrons freigesetzt wird. Die charakteristische Röntgenstrahlung entspricht der Energiedifferenz, die entsteht, wenn das beschleunigte Elektron beim Auftreffen auf die Anode ein Elektron des Anodenmaterials aus der inneren Schale herausschlägt und diese Lücke durch ein Elektron der äußeren Schale aufgefüllt wird.

Die so erzeugte Röntgenstrahlung besteht aus vielen Photonen, die, abhängig von ihrer jeweiligen Energie, beim Auftreffen auf Materie verschiedene Wirkungen entfalten. Photonen mit einer Energie niedriger als 50 keV wirken hauptsächlich über den Photoeffekt (Abbildung 6, A). Das Photon schlägt hierbei ein Elektron aus der inneren Hülle eines Atoms. Dieses herausgeschlagene Elektron wird Sekundärelektron genannt und kann durch die Wechselwirkung mit anderen Atomen in der Umgebung weitere Ionisationen hervorrufen. Hat das Photon, das auf die Materie trifft, eine Energie zwischen 0,1 bis 1 MeV, tritt vorwiegend der Compton-Effekt auf (Abbildung 6, B). Das Photon gibt durch das Anstoßen eines Elektrons in der äußeren Hülle des getroffenen Atoms Energie an dieses ab und fliegt anschließend mit reduzierter Energie in eine andere Richtung weiter. Beide Reaktionspartner können im Anschluss weitere Ionisationen in der Materie hervorrufen. Photonen mit einer noch höheren Energie können wiederum den Paarbildungseffekt hervorrufen, was dazu führt, dass das Photon im elektrischen Feld des Atomkerns in ein Elektron-Positron-Paar umgewandelt wird (Abbildung 6, C).



**Abbildung 6: Darstellung der verschiedenen Wechselwirkungen elektromagnetischer Strahlung mit Materie.**

(A) Beim Photoeffekt trifft ein Photon auf ein Elektron der inneren Schale eines Atoms, wodurch dieses aus dem Atom herausgeschlagen wird und als Sekundärelektron weitere Ionisationen in der umgebenden Materie verursachen kann. (B) Der Compton-Effekt zeigt sich, wenn ein Photon ein Elektron der äußeren Schale eines Atoms anstößt und dabei einen Teil seiner Energie an dieses abgibt. Das Photon fliegt anschließend mit verringerter Energie weiter und kann genau wie das angestoßene Elektron weiter ionisierend wirken. (C) Der Paarbildungseffekt entsteht, wenn ein Photon im elektrischen Feld des Atomkerns zerstört wird und sich so in ein Elektron-Positron-Paar umwandelt. Quelle: *modifiziert nach* <https://web-docs.gsi.de/~wolle/Schuelerlabor/gamma.html>

Die Wirkung der elektromagnetischen Strahlung entfaltet sich hauptsächlich über die Entstehung der Sekundärelektronen bei diesen Wechselwirkungen, woraus im Folgenden eine große Anzahl Ionen und Radikale resultieren können. Die Einheit der ionisierenden Strahlung ist das Gray, welches sich zusammensetzt aus der Energie in Joule, die über den Zeitraum der Bestrahlung von der exponierten Materie pro Kilogramm absorbiert wird.

In der Medizin werden Röntgenstrahlen zu verschiedenen Zwecken eingesetzt, niedrige Dosen zwischen 1 bis 10 mGy finden vor allem bei bildgebenden Verfahren Anwendung, höhere Dosen hingegen werden in der Krebstherapie eingesetzt. Hierbei werden fraktioniert Dosen bis zu einer lokalen Gesamtdosis von 80 Gy appliziert. In Einzelfällen kann diese lokale Dosis sogar noch überschritten werden. Ziel des therapeutischen Einsatzes in der Onkologie sind die Schädigung zellulärer Moleküle durch Ionisationen und das daraus resultierende Absterben der Krebszellen, wodurch der Tumor nicht-invasiv zerstört werden kann.

Am gravierendsten zeigt sich die Wirkung ionisierenden Strahlen in biologischen Systemen durch die Schädigung der DNA. So kommt es nach der Bestrahlung mit 1 Gy (Röntgenstrahlen) zu 1.000-2.000 Basenschäden, 800-1.600 Schäden des Zuckergerüsts der DNA, 500-1.000 Einzelstrangbrüchen, 200-300 alkalilabilen Stellen, 30 DNA-DNA *cross-links*, 20-40 Doppelstrangbrüchen sowie 150 DNA-Protein *cross-links* [55]. Diese Schäden können sowohl durch die direkte Wechselwirkung der Photonen und Sekundärelektronen mit der DNA entstehen (primäre Schäden), als auch indirekt durch

---

das Einwirken röntgeninduzierte Radikale (sekundäre Schäden) [56]. Ein Beispiel hierfür ist die Radiolyse von Wasser, die zur Entstehung von *Reaktiven Sauerstoffspezies* (ROS) führt. Befinden sich diese in der Nähe der DNA, kommt es zur Wechselwirkung zwischen den beiden Molekülen, wodurch wiederum sogenannten sekundäre Strangbrüchen entstehen können.

Für Strahlenschäden besonders anfällig sind proliferierende Zellen, da durch die Schädigung der DNA Mutationen hervorgerufen werden können, die anschließend an die Tochterzellen weitergegeben werden. Das Weitergeben solcher Schäden kann dazu führen, dass einzelne Zellen entarten und so zu potenziellen Krebszellen werden. Um dieses Auftreten genomischer Instabilität zu verhindern, werden in geschädigten Zellen eine Reihe von Signalkaskaden aktiviert, die für die Detektion, die Markierung sowie die Reparatur der geschädigten Stellen der DNA verantwortlich sind [57](s. 2.4). Des Weiteren stehen der Zelle eine Reihe von Mechanismen zur Verfügung, die einen phasenabhängigen Arrest des Zellzykluses zur Folge haben, wodurch eine Weitergabe von geschädigter DNA verhindert wird [58]. Ist die Anzahl der durch die Strahlung induzierten zellulären Schäden jedoch zu hoch, werden molekulare Prozesse aktiviert, die zelltypspezifisch zur Apoptose oder auch zur *Mitotischen Katastrophe* führen [59]. Kommt es zu Störungen in einer dieser schadensinduzierten Kaskaden, kann die Weitergabe möglicher Mutationen im Genom nicht mehr verhindert werden, wodurch trotz der bestehenden Signalkaskaden genomische Instabilitäten entstehen können [60]. Da diese über viele Zellteilungen hinweg erhalten bleiben, kann es auch in späteren Tochterzellen zu Entartungen kommen, aus denen schlussendlich doch noch Krebszellen entstehen können. Da die Entstehung solcher sekundärer Tumore eine der schlimmsten Nebenwirkungen der Strahlentherapie ist, muss bei der Planung einer solchen Therapie genau bedacht werden, welche Dosis lokal appliziert werden kann, um das maligne Gewebe möglichst vollständig zu zerstören und dabei das Risiko für das umliegende gesunde Gewebe so klein wie möglich zu halten. Jeder Faktor, der den Verlauf einer Tumorthherapie sowohl positiv als auch negativ beeinflussen kann, sollte hierbei bedacht werden, wodurch die Erforschung solcher Einflüsse für den Klinikalltag von großer Bedeutung ist.

### 2.3.3. NIR und Röntgenstrahlung – Vergleich und Kombination

Infrarot- und Röntgenstrahlen unterscheiden sich maßgeblich in ihren physikalischen Eigenschaften. Während die kurzwellige Röntgenstrahlung so energiereich ist, dass sie zu Ionisationsereignissen in der getroffenen Materie führt, hat der langwellige NIR-Bereich nur eine geringe Energie, die nicht ausreicht, um Moleküle oder Atome dauerhaft zu verändern. Trotz der nichtionisierenden Wirkungsweise der Infrarotstrahlung hat jedoch auch diese Strahlenart einen langfristigen Effekt auf verschiedene zelluläre Prozesse, der sich durch einen vorübergehend erhöhten Energieeintrag erklären lässt [36, 38, 39, 42, 45].

---

Neben dem energetischen Unterschied der beiden Strahlenarten unterscheiden sie sich auch wesentlich durch ihren jeweiligen Wirkort. Die Wirkung der ionisierenden Röntgenstrahlung zeigt sich am schwerwiegendsten durch Schäden der DNA (s. 2.3.2), die Infrarotstrahlung hingegen wirkt hauptsächlich auf die Mitochondrien. Dort wird sie beispielsweise von der *Cytochrom-C-Oxidase* (COX) absorbiert und führt so zu einem veränderten zellulären Metabolismus [37, 39, 42]. Unabhängig von dem jeweiligen Wirkort der beiden Strahlenarten treten jedoch auch vergleichbare Effekte durch die Bestrahlung auf. In beiden Fällen kann so beispielsweise ein intrazellulärer Anstieg *Reaktiver Sauerstoffspezies* (ROS) in Folge der Bestrahlung beobachtet werden. Im Zuge der Röntgenbestrahlung entstehen diese hauptsächlich durch die Radiolyse von Wasser [56], im Falle der NIR-Bestrahlung durch die zusätzliche Aktivierung der COX [42]. Durch die verschiedenen Entstehungsorte der strahleninduzierten ROS unterscheidet sich zwar die direkte Wirkung, der Abbau der Radikale wird jedoch durch dieselben Enzyme katalysiert [61]. Auch hat jede der beiden Strahlenqualitäten einen Einfluss auf die Expression verschiedener Gene [47, 57], wodurch sie beide Zellparameter wie Proliferation, Zellmetabolismus und Zelltod beeinflussen.

Jede der beiden Strahlenarten für sich wurde in den letzten Jahren sehr gut erforscht. Da Patienten jedoch im Zuge einer Krebstherapie, sei es aus therapeutischen Gründen oder durch einen Spaziergang in der Sonne, beiden Strahlenarten in Kombination ausgesetzt sein können, ist es von höchster klinischer Relevanz, auch die kombinierte Wirkung besser zu verstehen.

Die ersten Studien, die sich mit der Frage nach der biologischen Wirkung des nahen Infrarotspektrums in Kombination mit Röntgenstrahlung beschäftigen, stammen aus den 40er und 50er Jahren des 20igsten Jahrhunderts [6-10, 62-64]. In diesen Arbeiten wurde in den Modellorganismen *Tradescantia* und *Drosophila melanogaster* sowohl der Effekt einer vorgeschalteten als auch der einer nachgeschalteten NIR-Bestrahlung auf röntgeninduzierte chromosomale Schäden untersucht. Interessanterweise führte die Vorbestrahlung mit nahem Infrarot in beiden Organismen zu einer erhöhten Anzahl chromosomaler Aberrationen [7, 8, 10, 62]. Auch die Bestrahlung mit NIR nach einer Röntgenbestrahlung hatte in *Tradescantia* eine signifikante Erhöhung chromosomaler Anomalien zur Folge [7]. Bei der Untersuchung dieser Bestrahlungsfolge in *Drosophila melanogaster* zeigten sich hingegen widersprüchliche Ergebnisse. Während Kaufmann und Wilson keinerlei Einfluss einer nachgeschalteten NIR-Bestrahlung nachweisen konnten [63], beschrieben Glass *et al.* auch in *Drosophila* eine verstärkt schädigende Auswirkung auf chromosomaler Ebene durch die Kombination aus Röntgen- und einer nachgeschalteten Infrarotbestrahlung [64]. Welche genauen molekularen Prozesse zu der wechselseitigen Beeinflussung der beiden Strahlenarten führen, wurde in diesen Arbeiten nicht näher bestimmt, jedoch ergaben sich aus den beschriebenen Effekten mehrere Hypothesen über die Wirkweise der nahen Infrarotstrahlung in Kombination mit Röntgenstrahlen. So wurde von

---

den Forschern vermutet, dass die zusätzliche Infrarotbestrahlung entweder zu einer erhöhten Anzahl primärer chromosomaler Schäden führt oder aber die molekularen Mechanismen der Rekombination durch NIR beschleunigt werden. Letzteres hätte zur Folge, dass trotz einer vergleichbaren Zahl primärer Schäden vermehrt Aberrationen nach der kombinierten Bestrahlung im Vergleich zur ausschließlichen Röntgenbestrahlung auftreten würden. Vorstellbar wäre für die Autoren aber auch, dass diese beiden Mechanismen zusammenwirken [6, 7]. Generell lässt sich aus den Beobachtungen dieser frühen Arbeiten indes eine eher schädigende Wirkung der Kombination aus NIR und ionisierender Strahlung ableiten, weshalb die Frage nach der Übertragbarkeit dieser in *Tradescantia* und *Drosophila melanogaster* erbrachten Ergebnisse auf den Menschen von großer Bedeutung ist.

Heseli et al. zeigten 2012 erstmals, dass die Bestrahlung mit dem spektralen NIR-Bereich zwischen 0,6 -1,4  $\mu\text{m}$  auch in Säugerzellen einen Einfluss auf die röntgeninduzierte Stressantwort hat [11]. Durch die Vorbestrahlung mit NIR kam es in NIH/3T3-, R28- sowie HaCaT-Zellen zu einem Anstieg *Mitotischer Katastrophen* nach therapielevanten Röntgendosen. Des Weiteren zog die Vorbestrahlung mit NIR eine verzögerte Reparatur von röntgeninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) nach sich. Zwar wurden schlussendlich alle DSBs, sowohl in den ausschließlich mit Röntgenstrahlen, als auch in den kombiniert bestrahlten Zellen repariert, 4 h nach der Röntgenbestrahlung zeigte sich jedoch in den doppeltbestrahlten Zellen noch eine signifikant höhere Zahl unreparierter DSBs. Darüber hinaus wurde in dieser Studie ein deutlicher Einfluss der kombinierten Bestrahlung auf die Proliferation der untersuchten Zellen nachgewiesen. Während die Bestrahlung mit Röntgenstrahlen, aber auch die mit NIR alleine, zu einer Hemmung der Proliferation führte, war die Proliferationsrate der kombiniert bestrahlten Zellen signifikant erhöht. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch in Säugerzellen die Vorbestrahlung mit nahem Infrarot die schädigende Wirkung der ionisierenden Röntgenstrahlung verstärkt.

Dass neben dem breitbandigen NIR-Spektrum auch einzelne Wellenlängen des NIR-Bereichs einen Einfluss auf den Ausgang einer Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen haben können, zeigte eine Studie von Karu et al. aus dem Jahr 1994. Statt des gesamten NIR-Spektralbereichs wurde in dieser Studie mit Hilfe eines Lasers eine definierte Wellenlänge von 632,8 nm appliziert. Interessanterweise zeigten HeLa-Zellen, die mit dieser Wellenlänge vorbestrahlt und anschließend mit verschiedenen Dosen  $\gamma$ -Strahlung bestrahlt wurden, hier im Vergleich ein verbessertes Überleben [65]. Sollte sich diese Wirkung auch *in vivo* zeigen, würde diese Kombination den Ausgang einer Tumorthherapie maßgeblich verschlechtern.

Um dementsprechend das tatsächliche Risiko einer solchen kombinierten Exposition aus Wellenlängen des nahen Infrarotspektrums und ionisierender Strahlung für zukünftige Patienten besser abschätzen zu können, ist die Erforschung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen dieser kombinierten



---

Bestrahlung von größter klinischer Relevanz. Neben der Gefahr für gesundes Gewebe liegt in der verstärkt schädigenden Wirkung einer breitbandigen NIR-Vorbestrahlung jedoch möglicherweise auch die Chance der beschleunigten Reduktion eines malignen Tumors.

## 2.4. Zelluläre Mechanismen der DNA-Doppelstrangbruchreparatur

Der schwerwiegendste Schaden, der durch die Bestrahlung mit ionisierenden Strahlungen verursacht wird, ist der DNA-Doppelstrangbruch (DSB), da er zum Verlust genetischer Informationen führen kann [66]. Tritt ein solcher DSB z.B. in Folge einer Röntgenbestrahlung auf, werden in der betroffenen Zelle hierarchisch Mechanismen aktiviert, die die Detektion und die anschließende Reparatur dieses Schadens übernehmen. Im ersten Schritt erfolgt die Erkennung des Schadens über Sensorproteine, die im Anschluss Signale an sogenannte Mediatorproteine weitergeben. Die Aufgabe dieser Mediatorproteine ist die Verstärkung des Schadenssignals, sodass nachgeschaltete Effektorproteine die adäquate, zelluläre Antwort, zu der die DNA-Reparatur, ein Zellzyklusarrest oder sogar die Apoptose gehören, induzieren können [58, 67, 68].

### 2.4.1. Erkennung und Markierung von DNA-Doppelstrangbrüchen

Ist ein DSB entstanden, bindet zunächst der MRN-Komplex, bestehend aus den Sensorproteinen Mre11 (*Meiotic recombination 11 homolog*), Rad50 (*Radiation sensitive 50*) und NBS1 (*Nijmegen Breakage Syndrome 1*), an den DSB [69]. Darauf folgend wird einer der wichtigsten Faktoren der DNA-Schadensantwort, die Serin-Threonin-Kinase ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*), an den Bruch rekrutiert. Dieses zur Familie der Phosphatidylinositol 3-Kinase-ähnlichen Proteinkinasen (PIKK) gehörende Protein [70] liegt in der Zelle üblicherweise als inaktives Dimer vor. Durch die Rekrutierung an den DSB kommt es jedoch zur Autophosphorylierung des Proteins an Serin 1981, wodurch die Kinase in aktive Monomere zerfällt [71, 72]. Diese aktiven Monomere, aber auch andere Mitglieder der PIKK-Familie wie DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) oder ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*), phosphorylieren, zusammen mit dem MRN-Komplex, die Histonvariante H2AX an Serin 139, wodurch diese zu  $\gamma$ H2AX wird [73-75]. Diese Histonmodifikation ist für den Fortgang der DSB-Reparatur von besonderer Bedeutung, da es die Plattform für die Aktivierung, Rekrutierung sowie den Verbleib verschiedener Reparaturproteine am DSB bildet [76]. Durch die Phosphorylierung von H2AX wiederum wird das Protein MDC1 (*Mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) an den Schaden rekrutiert. Die Aufgabe dieses Proteins ist zum einen die Aktivierung weiterer ATM-Moleküle, wodurch die Phosphorylierung von H2AX-Histonen über weite



---

Bereiche rund um den DSB induziert wird [75]. Zum anderen rekrutiert MDC1 die E3-Ubiquitin-Ligase RNF8 (*RING-finger ubiquitin ligase 8*), die durch das Anhängen von K63-assoziierte Polyubiquitinketten an Histonen im Bereich des DSBs [77, 78] die Bindung einer weiteren E3-Ubiquitin-Ligase, der RNF168 (*RING-finger ubiquitin ligase 168*), hervorrufen [79]. Diese durch die zwei Ubiquitin-Ligasen aktivierte Ubiquitylierungskaskade bildet die Basis für die Rekrutierung weiterer wichtiger Proteine, wie beispielsweise das Mediatorprotein 53BP1 (*p53-binding protein 1*), an den zu reparierenden DSB [77, 79, 80].

#### 2.4.2. DSB-Reparaturkaskaden

Die tatsächliche Reparatur eines DSBs wird hauptsächlich über die Proteinkaskaden des *Non Homologous End Joining* (NHEJ) bzw. der *Homologe Rekombination* (HR) durchgeführt. Welcher der beiden Wege aktiviert wird, hängt vor allem von der Zellzyklusphase ab, in der sich die geschädigte Zelle befindet, kann aber auch durch die Komplexität des Schadens beeinflusst werden [81]. Im Zuge des NHEJs werden die beiden Bruchenden eines DSB einfach miteinander verknüpft, weshalb die Durchführung dieses Reparaturwegs in jeder Zellzyklusphase möglich ist [82]. Hauptsächlich aktiviert wird er jedoch während der G1/G0-Phase. Für die HR wiederum wird ein unbeschädigtes Schwesterchromatid als Matrix für die DSB-Reparatur benötigt, weshalb dieser Weg nur in Zellen durchgeführt werden kann, die sich in der späten S- bzw. in der G2-Phase befinden [82]. Durch das Verwenden einer Vorlage ist die Reparatur über diesen Weg relativ genau, während die reine Ligation während des NHEJs deutlich fehleranfälliger ist. Dies ist insbesondere der Fall, wenn die Bruchenden nicht direkt miteinander verknüpft werden können, sondern vor der Ligation prozessiert werden müssen, was zu Basenverlusten führen kann [83, 84].

Der initiale Schritt des NHEJs ist die Bindung des Ku70/Ku80-Heterodimers an die beiden Bruchenden [85]. An dieses Heterodimer bindet im nächsten Schritt die katalytische Untereinheit der DNA-PK (DNA-PKcs) [86]. Beide Proteine dienen dem Schutz der DNA-Enden vor Exonukleasen und halten diese in räumlicher Nähe zu einander [57, 86]. Die tatsächliche Verknüpfung der beiden Enden wird von einem Komplex, bestehend aus XRCC4 (*X-ray-complementin Chinese hamster gene 4*) und DNA-Ligase IV, durchgeführt, der durch die Bindung des Ku70/Ku80-Heterodimers und der DNA-PKcs an die Bruchenden rekrutiert wird [57, 87, 88].

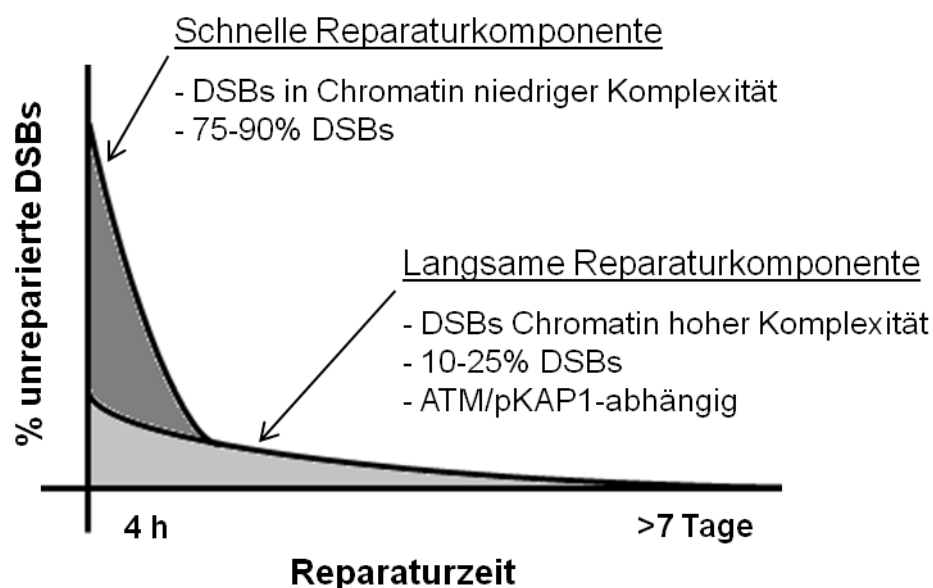
Der HR-Reparaturweg lässt sich in drei Phasen unterteilen. In der ersten bindet der MRN-Komplex an die Bruchenden, wodurch diese durch verschiedene Proteine wie CtIP (*CtBP interacting protein*), BLM (*Bloom-Syndrom-Protein*) und Exo1 (*Exonuclease 1*) zu einzelsträngigen DNA-Bereichen (ssDNA) resektiert werden [89-92]. Um diese Bereiche vor dem Abbau durch Nukleasen sowie vor der Ausbildung von intramolekularen Doppelsträngen zu schützen, bindet das Protein RPA (*Replication*

---

*protein A*) an die ssDNA. Dieses Protein wird im Folgenden durch das Zusammenspiel aus BRCA2 (*Breast cancer associated 2*) und Rad51 (*Radiation sensitive 51*) vom Bruchende verdrängt, wodurch die nächste Phase eingeleitet wird [93-95]. Das Nukleofilament, bestehend aus Rad51 und der ssDNA, beginnt nun mit der Homologiesuche und der anschließenden Stranginvasion [57, 96]. In der abschließenden Phase wird mit Hilfe des als Matrize fungierenden Schwesterchromatids der geschädigte DNA-Abschnitt durch DNA-Polymerasen neu synthetisiert und durch Ligasen neu verknüpft. Die durch die Ligation entstandenen Holliday-Strukturen der DNA werden zum Schluss des Reparaturprozesses durch verschiedene Nukleasen und Helikasen entfernt [97, 98].

Die Reparatur von DSBs verläuft unabhängig von der Zellzyklusphase, in der sich eine Zelle befindet, biphasisch, das bedeutet, dass DSBs entweder mit schneller oder aber mit deutlich langsamerer Kinetik repariert werden. In den ersten 4-6 h werden so etwa 85% aller DSBs repariert, während die Reparatur der verbleibenden 15% einige Tage dauern kann [99]. Grund für diese zeitliche Diskrepanz ist die jeweilige Chromatinstruktur, in der ein DSB entstanden ist (Abbildung 7). Chromatin, die Organisationsform, in der die DNA um verschiedene Histone gewickelt im Zellkern vorliegt, wird je nach Kondensationsgrad in Euchromatin (EC) und Heterochromatin (HC) unterteilt. Im EC befinden sich die transkriptionell aktiven Abschnitte der DNA, weshalb es eher locker gepackt und damit für die Transkriptionsmaschinerie leicht zugänglich ist. Heterochromatische DNA ist hingegen stark kondensiert und wird weiter unterteilt in fakultatives bzw. konstitutives Heterochromatin. Das fakultative HC beinhaltet zwar kodierende DNA-Bereiche, durch die starke Kondensation sind diese Gene allerdings stillgelegt. Sollte ein Gen jedoch wieder benötigt werden, kann dieser DNA-Abschnitt in Euchromatin umgewandelt werden, sodass er für Proteine, die für die Transkription benötigt werden, erneut zugänglich ist. Konstitutives Heterochromatin hingegen besteht für gewöhnlich aus repetitiven DNA-Sequenzen, die durch die dichte Packung dauerhaft blockiert sind. Diese Chromatinstruktur findet man nur im Bereich des Zentromers und der Telomere. Der jeweilige Kondensationsgrad der DNA wird unter anderem durch verschiedene epigenetische Modifikationen der Histone erreicht. Charakteristisch für euchromatische Bereiche sind beispielsweise die Methylierung des Histons H3 an Lysin 4 (H3K4me) oder auch dessen Acetylierung an Lysin 9 (H3K9ac). Im Heterochromatin hingegen ist H3 sowohl an Lysin 9 (H3K9me3) als auch an Lysin 27 trimethyliert (H3K27me3) [100]. Neben diesen Histonmodifikationen spielen auch heterochromatinbildende Proteine, wie HP1 (*Heterochromatin protein 1*), HDACs (*Histon deacetylases*) und ATP-abhängige Chromatin-Remodeller eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des stark kondensierten Zustands der DNA im HC. Die Plattform für die Ansammlung dieser Faktoren bildet das Protein KAP1 (*Krüppel-associated protein 1*).

Durch die starke Kondensation ist die DNA in den heterochromatischen Bereichen jedoch nicht nur für die Proteine der Transkriptionsmaschinerie schwer zugänglich, sondern auch für Reparaturfaktoren. Damit die für die Reparatur wichtigen Proteine an den DSB gebracht werden können, muss somit zuerst die DNA an den Schadensstellen dekontensiert werden, bevor die Reparatur beginnen kann. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die DSBs, deren Reparatur mit schneller Kinetik durchgeführt wird, hauptsächlich im EC der Zellen zu finden sind, während die DSBs, deren Reparatur langsam verläuft im HC lokalisiert sind [99, 101, 102]. Diese langsame Komponente der DNA-Reparatur ist ATM-abhängig. Die Aufgabe der ATM-Kinase ist hierbei die Phosphorylierung des Proteins KAP1 an Serin 824, wodurch es zu einer lokalen Aufweichung des HCs an der Schadensstelle kommt [12-14]. Durch diese Auflockerung wird den Reparaturproteinen der Zugang zur geschädigten DNA ermöglicht.



**Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur.**

Die Reparatur von DSBs verläuft in Abhängigkeit ihrer Lokalisation im Chromatin der Zellen biphasisch. In den ersten circa 4 h werden etwa 85% der DSBs repariert, die verbleibenden 15% werden sehr viel langsamer abgebaut. Diejenigen DSBs, die mit schneller Kinetik repariert werden, befinden sich hierbei im Euchromatin, während die langsam reparierten DSBs im Heterochromatin der Zellen lokalisiert sind. Durch den hohen Kondensationsgrad der DNA in HC-Bereichen sind Schäden für Reparaturfaktoren erst dann zugänglich, wenn das Chromatin an dieser Stelle durch die ATM-abhängige Phosphorylierung des HC-Bildners KAP1 lokal aufgelockert wird, wodurch es zu einer zeitlichen Verzögerung der Reparatur kommt. Quelle: *modifiziert nach* [99]

Die Reparatur der euchromatischen Brüche in den ersten etwa 4 h wird unabhängig von der Zellzyklusphase, in der sich die Zelle befindet, immer über die Proteine des NHEJ-Signalwegs bewerkstelligt. Die langsame Reparatur der heterochromatischen DSBs hingegen wird

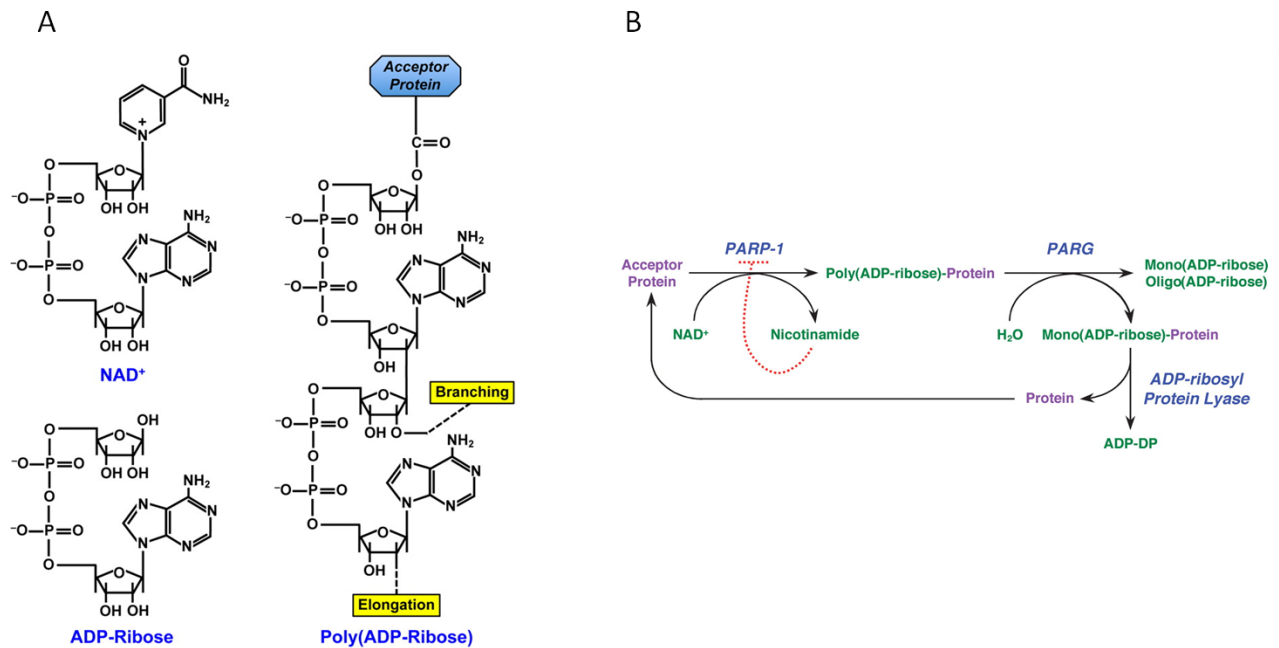
---

zellzyklusphasenabhängig reguliert. Während Zellen in der G2-Phase heterochromatische Brüche über HR beseitigen, nutzen Zellen, die sich in der G1/0-Phase befinden, auch zur Reparatur von heterochromatischen Brüchen die klassischen Proteine des NHEJs [99]. Da jedoch, anders als beim kanonischen NHEJ, der Beginn der Reparatur dieser Brüche scheinbar abhängig von den Proteinen ATM und Artemis ist, wird dieser Prozess in der Literatur als langsamer alternativer NHEJ-Unterweg beschrieben [103].

## 2.5. Proteine und Signalwege

### 2.5.1. PARP-1 (*Poly (ADP-ribose) polymerase 1*)

Poly(ADP-ribosyl)ierung ist eine posttranslationale Proteinmodifikation, die durch die Enzyme der PARP-Familie katalysiert wird. PARP-1, das prominenteste Mitglied dieser Familie, besitzt drei funktionelle Domänen. N-terminal gelegen finden sich zwei Zinkfinger-Domänen, die als DNA-Bindestelle fungieren. Die zweite Domäne, die sogenannte „*automodification domain*“, liegt in der Mitte des Enzyms und dient als Ziel für Auto-Poly(ADP-ribosyl)ierungen. Am C-terminalen Ende befindet sich das katalytische Zentrum des Enzyms. Mit Hilfe dieser Domäne generiert PARP-1 aus dem Substrat  $\text{NAD}^+$ -ADP-Ribose-Monomere, die es dann kovalent an verschiedene Proteine als Poly-ADP-Ribose-Ketten (PAR) anhängt (Abbildung 8, A). Auf welche Faktoren die Poly(ADP-ribose)polymerasen wirken, wird über die Auto-PARYlierungen der „*automodification domain*“, festgelegt. Gegenspieler der PAR-Polymerasen ist das Enzym PARG (*Poly (ADP-ribose) glycohydrolase*), das gebundene Poly-ADP-Ribose-Moleküle wiederum zu freien ADP-Ribose-Monomeren hydrolysiert (Abbildung 8, B) [104, 105].



**Abbildung 8: Darstellung der Wirkweise von PARP und PARG.**

(A) PARP-1 katalysiert aus  $\text{NAD}^+$  ADP-Ribose-Monomere, die dann als Poly-ADP-Ribose-Ketten kovalent an Akzeptorproteine angehängt werden. (B) PARG antagonisiert diesen Prozess, indem es gebundene ADP-Ribose-Moleküle wieder abspaltet.

Quelle: (A) [105], (B) [106]

Die Poly(ADP-ribosyl)ierung durch PARP-1 spielt bei einer Vielzahl nukleärer Prozesse eine wichtige Rolle. Neben Modifikationen des Chromatinstatus gehören vor allem die Regulation der Transkription sowie die DNA-Reparatur zu den wichtigsten Aufgaben von PARP-1 [107-109].

Im Zuge der DNA-Reparatur fungiert PARP-1 als Sensor für *DNA-nick-ends*. Hat das Protein einen solchen detektiert, bindet es an die DNA und beginnt seine „*automodification domain*“ zu poly(ADP-ribosyl)ieren [110]. Durch diese Automodifikation kann es mit anderen Proteinen interagieren, die für die Reparatur von DNA-Schäden wichtig sind [111-113]. Da PARP-1 vor allem *nick-ends* erkennt, ist es überwiegend an Einzelstrangbrüchen (SSB) zu finden [114], wobei automodifiziertes PARP-1 hierbei hauptsächlich mit XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing protein 1*) und Polymerase  $\beta$ , die beide zu den Schlüsselkomponenten des „*Base excision repair*“-Signalweges gehören, interagiert [57, 115]. In den letzten Jahren wurde jedoch immer deutlicher, dass PARP-1 auch an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt ist. Zu seinen Aufgaben hierbei zählen die Poly(ADP-ribosyl)ierung verschiedener Histonvarianten [109], sowie die Aktivierung von ATM [116]. Neben diesen regulären Aufgaben im Zuge der DSB-Reparatur konnte jedoch weiterhin gezeigt werden, dass PARP-1 der Hauptakteur des sogenannten „*Backup NHEJs*“ (B-NHEJ) ist. Sind essentielle Proteine des NHEJ-Reparaturweges, wie beispielsweise das Ku70/Ku80-Heterodimer oder auch

---

DNA-PK, in Zellen nicht vorhanden, können diese DSBs über einen langsamen Alternativweg repariert werden, der zwar sehr fehleranfällig ist, den Zellen aber trotzdem ermöglicht, dem Zelltod zu entgehen [117, 118]. PARP-1 aktiviert hierbei, wie im Zuge der SSB-Reparatur, nach Erkennen eines *DNA-nick-ends* die Proteine XRCC1 und DNA-Ligase III, die im Folgenden die DNA-Enden des DSBs neu verknüpfen [118, 119].

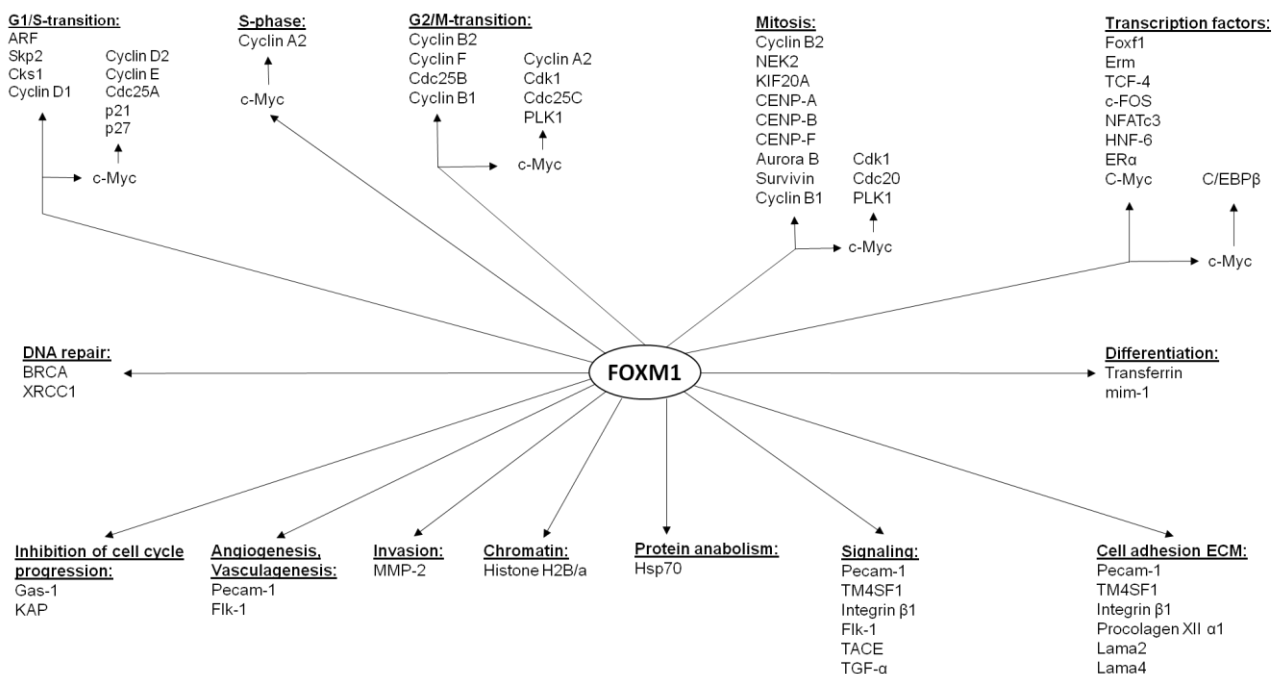
Abgesehen von diesen reparatur-assoziierten Aufgaben im Zellkern übernimmt PARP-1 noch weitere wichtige Funktionen in verschiedenen zellulären Prozessen. So ist PARP-1 durch seine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor NFκB beispielsweise maßgeblich an der Regulation der Immunantwort von Zellen beteiligt [107, 120]. Des Weiteren wird PARP-1 als „*Master switch*“ zwischen Apoptose und Nekrose beschrieben [121]. Auch konnte gezeigt werden, dass das Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau von Poly(ADP-ribosyl)ierung bei der Aufrechterhaltung genomischer Stabilität von großer Bedeutung ist. *Ame et al.* konnten beispielsweise mittels *PARG-Knockdown* in HeLa-Zellen nachweisen, dass die fehlende Hydrolyse von Poly(ADP-ribosyl)ierung in diesen Zellen zu einem starken Anstieg *Mitotischer Katastrophen* nach ionisierender Strahlung führt [122].

### 2.5.2. FOXM1 (*Forkhead box protein M1*)-Signalweg

FOXM1 (*Forkhead box protein M1*), auch Trident, HNF-3 oder HFH-11 genannt, ist ein Transkriptionsfaktor der *Forkhead box (FOX)* Protein-Superfamilie. Die Gemeinsamkeit aller FOX-Transkriptionsfaktoren ist die aus 100 Aminosäuren bestehende *winged helix DNA-binding domain*, mit der sie an bestimmte Promotorregionen binden können und so die Transkription einer Vielzahl von Genen bestimmen [123, 124]. Während der embryonalen Entwicklung wird FOXM1 ubiquitär in allen Zellen exprimiert, in terminal differenzierten Zellen wird die Expression des Transkriptionsfaktors jedoch unterdrückt [125]. Lediglich in einigen regenerativen Geweben wie Leber und Haut findet man auch im adulten Zustand noch FOXM1-Proteine [125-127]. Da in vielen Krebsarten, wie beispielsweise Basalzell- oder auch Brustkarzinomen, eine sehr starke FOXM1-Expression nachweisbar ist, gilt FOXM1 als Transkriptionsfaktor mit onkogener Wirkung [128-130].

Die meisten der durch FOXM1 regulierten Genprodukte sind Bestandteil der Signalkaskaden der Zellteilung. So stimuliert FOXM1 sowohl die Expression von Proteinen des G1/S-Phasen- als auch des G2/M-Phasenübergangs. Des Weiteren übernimmt dieser Transkriptionsfaktor wichtige Funktionen bei der Regulation des S- sowie M-Phasenverlaufs [124, 125, 131, 132]. Neben diesen direkt mit dem Verlauf des Zellzyklus assoziierten Aufgaben ist FOXM1 auch maßgeblich am Erhalt der Integrität des Spindelapparates beteiligt [133]. Zu den proliferationsassoziierten Genen, die durch FOXM1 kontrolliert werden, gehören beispielsweise die Zentromer/Kinetochor-Komplexproteine CENP-A, B

und F (*Centromere protein A, B, F*). Diese sind für den Aufbau des Zentromer/Kinetochor-Komplexes sowie für die korrekte Separation der Schwesterchromatiden während der Mitose mitverantwortlich [124, 125, 134-136]. Auch die Expression von Nek2 (*NIMA-related kinase 2*) und Aurora B, die beispielsweise Aufgaben bei der Formation des Spindelapparates sowie bei der Verbindung der Spindelfasern mit den Zentromeren im Zuge der Chromosomensegregation übernehmen, wird durch FOXM1 vermittelt [137-139]. Die Proteinkinasen PLK1 (*Polo-like-kinase 1*) und Cdc2 (Cdk1, *Cyclin-dependent kinase 1*), die beide für den korrekten Verlauf der Mitose, aber auch für den korrekten G2/M-Phaseübergang wichtig sind, stehen ebenfalls unter der Expressionskontrolle von FOXM1 [125]. Ein weiterer wichtiger zellulärer Prozess, auf den FOXM1 als Transkriptionsfaktor einen direkten Einfluss nimmt, ist die DNA-Schadensantwort [140]. Durch die schadensinduzierte Aktivierung der Expression von Proteinen wie NBS1, EXO1, BRCA2 sowie XRCC1 ist FOXM1 ein wichtiger Akteur der Einzel- und Doppelstrangbruchreparatur [125, 141-143]. Neben diesen Signalkaskaden greift FOXM1 noch in eine Vielzahl weiterer zellulärer Prozesse ein. Die Wirkung von FOXM1 auf die verschiedenen Signalwege ist hierbei zum einen direkt, durch die Expressionskontrolle weiterer primär beteiligter Faktoren, zum anderen aber auch indirekt durch die Regulation der Expression diverser untergeordneter Transkriptionsfaktoren (Abbildung 9) [125].



**Abbildung 9: Übersicht der verschiedenen Faktoren, deren Expression durch FOXM1 reguliert wird.**

Der Transkriptionsfaktor FOXM1 reguliert Gene, deren Produkte in vielen verschiedenen zellulären Prozessen wichtige Funktionen übernehmen. Quelle: *modifiziert nach* [125]



---

Wie weitreichend die Wirkung von FOXM1 tatsächlich ist, demonstrieren *in vivo*-Studien mit FOXM1-Knockout-Mäusen. Kam es zur Ausprägung eines FOXM1<sup>-/-</sup>-Genotyps, so verstarben die betroffenen Embryonen bereits *in utero*. Bei der näheren Untersuchung dieser Embryonen zeigte sich, dass es durch das Fehlen des Transkriptionsfaktors zu einer tödlichen Fehlentwicklung des Herzens, der Leber sowie der Lunge kam [125]. Verschiedene *in vitro*-Studien belegen diese bedeutende Funktion von FOXM1 für das Überleben auch auf zellulärer Ebene. Sowohl eine Hoch- als auch eine Herunterregulation dieses Transkriptionsfaktors führte in diesen Arbeiten zu einem vermehrten Auftreten genomischer Instabilität [129, 133, 144].

Diese Beobachtungen in Zusammenhang mit dem Nachweis einer starken Hochregulation von FOXM1 in verschiedenen Krebsarten machen deutlich, wie wichtig die korrekte Regulation dieses Transkriptionsfaktors für den Organismus ist und welche fatalen Auswirkungen eine Fehlregulation haben kann.

### 2.5.3. Apoptose und Stress Signaling

Der Erhalt der gesunden Physiologie einer Zelle wird durch viele sehr gut in einander greifende Prozesse gewährleistet, die zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase unabdingbar sind. Wird dieser reibungslose Ablauf innerhalb der Zelle durch irgendein Ereignis gestört, geraten die Zellen in Stress und müssen Prozesse aktivieren, die entweder den normalen Zustand wiederherstellen oder aber, wenn der Schaden zu groß ist, die Apoptose einleiten. Stressverursachende Faktoren können beispielsweise das Eindringen von Pathogenen, aber auch die Wirkung von chemischen Substanzen sowie physikalischen Einflüssen sein. Stresssignale äußern sich intrinsisch durch den Anstieg *Reaktiver Sauerstoffspezies* bis hin zu oxidativem/metabolischem Stress, was zur Aktivierung verschiedener Signalwege mit dem Ziel der Wiederherstellung des Grundzustands, aber auch zur Induktion der Apoptose führen kann [145]. Auch die Freisetzung von Zytokinen und die daraus resultierende parakrine Wirkung gehören zu den Signalen, welche die zelluläre Stressantwort auslösen [146]. Des Weiteren führt die Detektion von Protein- oder DNA-Schäden zur Stimulation verschiedener stressassoziierten Proteinkaskaden, wie der DNA-Reparatur oder der Einleitung eines Zellzyklusarrestes [58, 67, 68].

Die zelluläre Stressantwort setzt sich aus vielen verschiedenen Komponenten zusammen. Zu Beginn dieser Antwort muss der Schaden detektiert werden. Wurde das Auftreten einer zellulären Stresssituation registriert, wird je nach Art des Stresssignals und des betroffenen Zelltyps eine adäquate Reaktionsfolge aktiviert. Zu den weiterleitenden Proteinen können hierbei verschiedene MAPK-Vertreter (*Mitogen activated protein kinases*) gehören, wie p44/42 Erk1/2 (*Extracellular-signal regulated kinase*), p38, SAPK/JNK (*Stress-activated phospho-kinase/c-Jun N-terminale kinase*) oder auch



---

TAK1 (*Transforming growth factor beta-activated kinase 1*). MAPK-Proteine sind evolutionär hoch konserviert und leiten über die Verbindung mit Oberflächenrezeptoren Signale ins Innere der Zellen weiter, wodurch das Zellüberleben und die Adaption an zellulären Stress gewährleistet werden können [147]. Auch die Proteine des PKB/Akt-Signalwegs (*Proteinkinase B*) gehören zu den signalweiterleitenden Proteinen nach Stressinduktion. Genau wie die MAPKinasen werden sie durch Rezeptoren an der Zelloberfläche aktiviert, wodurch sie sowohl aktivierenden als auch inhibierenden Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Metabolismus, Proliferation und Wachstum nehmen können [148]. Ein weiteres Protein, das an der intrazellulären Signaltransduktion in Folge eines Stresssignales maßgeblich beteiligt ist, nennt sich eIF2 (*Eukaryotic Initiation Factor 2*). Dieser aus drei Untereinheiten bestehende Faktor kontrolliert die Translation von mRNAs. Wird die  $\alpha$ -Untereinheit an Serin 51 phosphoryliert, wirkt eIF2 inhibierend auf die allgemeine Proteinsynthese, kann gleichzeitig aber auch dazu führen, dass die Synthese von stressassoziierten Proteinen gesteigert wird [149]. Neben der über Oberflächenrezeptoren vermittelten Stressantwort können Zellen Schäden, wie DNA-Brüche, auch direkt detektieren und so intrinsische Signalkaskaden starten. Ziel dieser Kaskaden ist die Reparatur der DNA, um die Weitergabe von Schäden an Tochterzellen zu verhindern. Um den Reparaturfaktoren Zeit zur Beseitigung der Schäden zu verschaffen, wird der Zellzyklus arretiert. Zu den Proteinen, die in Folge eines DNA-Schadens einen Zellzyklusarrest induzieren können, gehören z.B. die Serin/Threonin-Kinasen Chk1 und Chk2 (*Checkpoint kinase 1 & 2*). Diese werden in Folge eines solchen Schadens durch die Phosphatidylinositol 3-Kinase-ähnlichen Proteinkinasen (PIKK) ATR, bzw. ATM phosphoryliert (Chk1 Ser345, Chk2 Thr68), was zur Aktivierung ihrer Kinasedomänen führt. Durch diese Phosphorylierung können sie auf eine Reihe von Zielproteinen wirken, deren Zusammenspiel zum Stop des Zellzykluses führt [145].

Zellulärer Stress verursacht neben der direkten Aktivierung bereits vorhandener Proteine auch eine Veränderung der Genexpression. Dies wird durch die Aktivierung verschiedenster Transkriptionsfaktoren über die oben beschriebenen signalweiterleitenden Proteine erreicht. Zu den wichtigsten stressassoziierten Transkriptionsfaktoren gehören das Tumorsupressorprotein p53, NF $\kappa$ B (*Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) und Smad2 (Verbindung aus Sma (*small body size, Caenorhabditis elegans*) und Mad (*Mothers against decapentaplegic, Drosophila melanogaster*)). p53 ist hierbei ein Schlüsselfaktor der DNA-Schadensantwort. Durch die Phosphorylierung an Serin 15 wird das Protein stabilisiert und kann so hunderte von Genen aktivieren, deren Produkte unter anderem im Zusammenhang mit DNA-Reparaturprozessen, Zellzykluskontrolle und Apoptose stehen [150, 151]. Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B ist Teil der pro-inflammatorischen Immunantwort aller Zellen. Unter physiologischen Bedingungen bildet NF $\kappa$ B im Zytoplasma einen inhibierten Komplex mit I $\kappa$ B $\alpha$ . In Folge einer durch verschiedene Stimuli, wie beispielsweise der

---

Ausschüttung von TNF $\alpha$  (*Tumornekrosefaktor- $\alpha$* ), induzierten Phosphorylierung des Inhibitorproteins I $\kappa$ B $\alpha$  an Serin 32/36 wird dieses ubiquitiniert und durch das 26S Proteasom abgebaut. Durch den Abbau des inhibierenden Faktors wird NF $\kappa$ B freigesetzt und kann in den Kern transportiert werden [15, 16]. Welche Aufgaben NF $\kappa$ B im Kern genau übernimmt, wird durch eine Reihe posttranslatieller Modifikationen festgelegt [152]. Smad-Proteine werden durch Zytokine der TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* )-Superfamilie aktiviert. Sie werden unterteilt in R-Smads (Rezeptor-Smads), Co-Smads (Common-mediator Smads) und I-Smads (inhibitorische Smads). Während es verschiedene R-Smads (Smad1, 2, 3, 5, 8/9) gibt, existiert bislang nur ein einziges Co-Smad (Smad4). Zu den inhibitorisch wirkenden I-Smads zählen Smad6 und 7 [153]. R-Smads, zu denen auch Smad2 gehört, sind in diesem Signalweg das Bindeglied zwischen Rezeptor und Co-Smad, d.h. aktivierte Zelloberflächen-Rezeptoren phosphorylieren R-Smads, wodurch sich diese mit Co-Smads zu einem Komplex verbinden und so in den Zellkern translozieren können, wo sie dann als aktive Transkriptionsfaktoren agieren. Die Aufgabe von I-Smads ist es, die Komplexbildung zwischen R- und Co-Smads zu verhindern, wodurch ihr Transport in den Zellkern unterbunden wird [153-155].

Alle bisher beschriebenen Stressreaktionen können zur Adaption der Zellen an die neue Situation und so zum Überleben der Zellen in Stresssituationen führen. Kann das Überlebensprogramm jedoch nicht umgesetzt werden, wird die Apoptose eingeleitet. Der Prozess der Apoptose wird auch programmierter Zelltod genannt, da die Zellen selbst die Signalkaskaden aktivieren, die schlussendlich zum Absterben führen. Auch im Zusammenhang mit diesem molekularen Ereignis gibt es aktivierende und inhibierende Faktoren, erstere nennt man pro-apoptotisch, letztere anti-apoptotisch. Zu den pro-apoptotischen Faktoren zählen Caspasen (*CysteinyI-aspartate specific protease*) oder auch das zur Familie der Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*)-Proteine gehörende Bad (*Bcl-2-associated death promoter*). Caspasen liegen als inaktive Proenzyme immer im Zytoplasma der Zellen vor. Wird entweder über extrinsische oder intrinsische Signale die Apoptose induziert, werden verschiedene Caspasen durch das Abtrennen ihrer Prodomäne aktiviert und sind dann für die proteolytische Spaltung und Zerstörung von Zielproteinen zuständig. Auch aktivieren sie über diesen Weg bestimmte Endonukleasen, die für die Degradation der DNA im Zuge des programmierten Zelltodes zuständig sind. Welche Proteine durch welche Caspasen gespalten werden, hängt hierbei jeweils von der präferierten Aminosäuresequenz, an der sie schneiden, ab. Alle Caspasen zeichnen sich jedoch dadurch aus, dass sie an einer C-terminal gelegenen Peptidbindung vor einem Aspartat schneiden, was ihnen auch ihren Namen eingebracht hat [156]. Beispielhaft für diese Funktion der Caspasen ist die proteolytische Spaltung des DNA-Reparaturproteins PARP-1. Dieses Protein wird sowohl von cCaspase-3 (*cleaved Caspase-3*) als auch von cCaspase-7 (*cleaved Caspase-7*) in ein 24 kDa sowie ein 89 kDa großes Fragment aufgespalten [157]. Der Nachweis der PARP-1-Fragmentierung kann somit als Marker eines

---

erhöhten Vorkommens des programmierten Zelltods gesehen werden [121]. Bad fördert den Verlauf der Apoptose, indem es anti-apoptotische Proteine bindet und so dafür sorgt, dass diese nicht inhibierend in die Vorgänge des programmierten Zelltods eingreifen können [158]. Wird Bad jedoch durch PKB/Akt an Serin 136 phosphoryliert, kann es seine pro-apoptotische Wirkung nicht mehr entfalten [159].

Apoptose-hemmend wirkende Proteine sind beispielsweise Survivin und Hsp27 (*Heat shock protein 27*). Survivin kommt vor allem in Krebs- und nicht in den normalen Zellen vor [160], kann jedoch auch in diesen Zellen unter pathogenen Umständen nachgewiesen werden [161]. Wie genau Survivin die Apoptose hemmt, ist noch nicht vollständig verstanden, vermutet wird jedoch, dass das Protein inhibierend auf die Funktion der Caspasen wirkt [162]. Hsp27 inhibiert die Apoptose über verschiedene Mechanismen, zu denen auch die Inhibition der Caspasen gehört. Des Weiteren kann es durch seine Chaperoneigenschaft das Zellüberleben unterstützen [163].

Betrachtet man das komplexe Zusammenspiel all dieser hier erwähnten Proteine, die sogar nur einen Auszug dessen widerspiegeln, was in Zellen im Zuge eines Stresssignales geschieht, wird deutlich, dass jeder Reiz, der auf Zellen wirkt, eine gigantische Anzahl an Faktoren aktiviert bzw. inhibiert. Selbst wenn der Ausgang einer bestimmten medizinischen Behandlung bekannt zu sein scheint, kann dieser durch eine Vielzahl von zusätzlichen Reizen stark verändert werden.

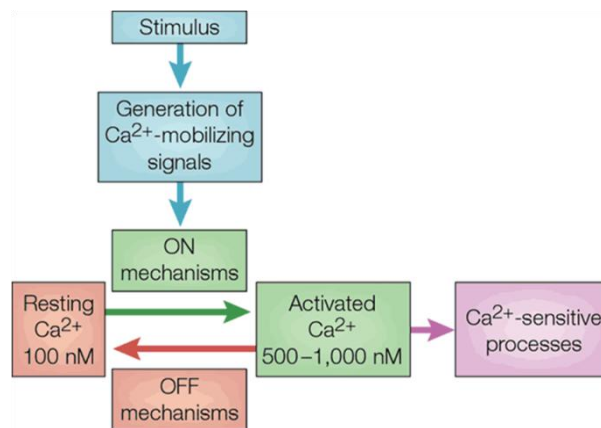
## 2.6. Sekundäre Botenstoffe im Zellmetabolismus

### 2.6.1. $\text{Ca}^{2+}$ (*Calcium*)

Etwa 90% des im Körper vorhandenen Calciums befindet sich in Form von gebundenem Hydroxylapatit im Knochen. Sowohl in der extrazellulären Flüssigkeit als auch im Inneren von Zellen findet man jedoch auch freie Calciumionen, die als solche wichtiger Bestandteil diverser Signalübertragungskaskaden sind, zu denen Mechanismen wie die Reizweiterleitung von Nervenzellen, die Sekretion von Hormonen sowie die Muskelkontraktion gehören [164-166]. Das Calcium für eine solche Signalweiterleitung kommt vorwiegend aus dem extrazellulären Raum, dessen Calciumkonzentration 1,2 mM beträgt, oder aber aus dem *Endoplasmatischen Retikulum* (ER), bzw. dessen Äquivalent in Muskelzellen, dem *Sarkoplasmatischen Retikulum* (SR), die als intrazelluläre Calciumspeicher dienen. Die physiologische Calciumkonzentration des Zytoplasmas liegt zwischen 50 und 100 nM. Durch das Eindringen von Calciumionen im Zuge der Signalweiterleitung kann diese auf bis zu 1000 nM ansteigen [166, 167].

Den Verlauf eines solchen Calciumsignals kann man in vier Phasen unterteilen (Abbildung 10):

1. Detektion eines Stimulus
2. dem daraus resultierenden Anstieg der Calciumkonzentration im Zytoplasma („ON-Mechanismus“)
3. der Aktivierung bzw. Inhibition verschiedener Calcium-abhängiger intrazellulärer Prozesse und zum Abschluss
4. das Entfernen der überschüssigen Calciumionen aus dem intrazellulären Raum („OFF-Mechanismus“) [166]



**Abbildung 10: Darstellung der 4 Phasen eines zellulären Calciumsignals.**

Der Verlauf eines zellulären Calciumsignals gliedert sich in 4 Phasen. Zu Beginn wird ein bestimmter Stimulus detektiert, woraus die Mobilisierung verschiedener sekundärer Botenstoffe resultiert. Durch diese Signale wird im Folgenden der Einstrom von Calcium in das Zytoplasma der Zellen induziert. Durch den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, auch „On-Mechanismus“ genannt, kommt es zur Aktivierung bzw. Inhibition verschiedener Calcium-abhängiger Prozesse in den betroffenen Zellen. Um das Calcium-Signal zu beenden wird, das überschüssige Calcium dann wieder aus dem intrazellulären Raum entfernt („OFF-Mechanismus“). Quelle: [166]

Die Detektion eines Stimulus kann z.B. über eine große Zahl von Rezeptoren an der Zelloberfläche übernommen werden. Zu den möglichen Stimuli gehören unter anderem Wachstumsfaktoren und Hormone, aber auch Calcium selbst kann stimulierende Wirkung haben [168]. Die Folge der Detektion eines solchen Stimulus äußert sich in der Mobilisierung verschiedener sekundärer Botenstoffe, die im Folgenden den Einstrom von Calcium in die Zelle veranlassen [166]. Da biologische Membranen für Ionen undurchlässig sind, wird der Calciumeinstrom über Transmembrankanäle vermittelt. Zu diesen Kanälen gehören VOCs (*Voltage-operated channels*), ROCs (*Receptor-operated channels*) oder auch SOC (Store-operated channels) in der Zellmembran sowie die beiden Haupttypen RyR (*Ryanodine receptor*) und InP<sub>3</sub>R (*Inositol-1, 4, 5-triphosphate receptor*) in der Membran des ERs, bzw. des SRs [166, 169, 170]. Im Zytoplasma treffen Calciumionen zum einen auf Proteine, die eine Art Pufferfunktion

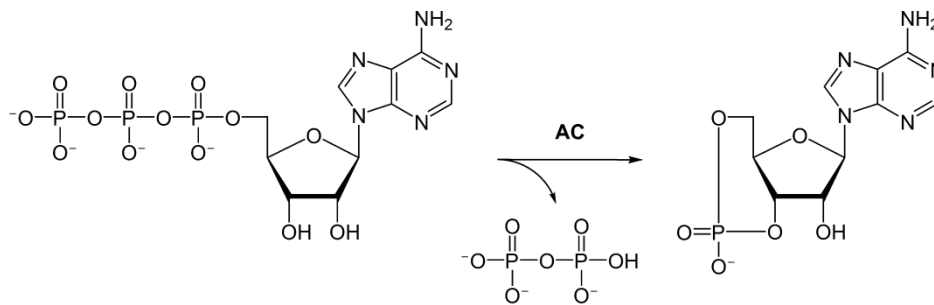
---

übernehmen, indem sie freies Calcium binden und so die zeitliche sowie räumliche Komponente des Calcium-Signalings beeinflussen. Zum anderen kann Calcium als sekundärer Botenstoff mit einer Vielzahl intrazellulärer Sensoren (z.B. *Calmodulin*) interagieren. Diese Sensoren nehmen die Veränderungen der zytoplasmatischen Calciumkonzentration wahr und können dadurch Einfluss auf verschiedene zelluläre Prozesse, wie Proliferation, Genexpression, Differenzierung sowie die Apoptose nehmen [166, 168, 171]. Die vierte Phase beendet die Signalwirkung, indem  $\text{Ca}^{2+}$  über Pumpen und Austauscher, wie PMCA (*Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase*), SERCA (*Sarcoplasmic/ endoplasmatic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase*) oder den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, in den Extrazellulärraum oder in Zellorganellen zurückgepumpt wird, bis die physiologische Calciumkonzentration im Zytoplasma wiederhergestellt ist [168]. Bei diesem abschließenden Vorgang übernimmt nicht alleine das ER/SR die Rolle des Calciumspeichers, auch die Mitochondrien nehmen freies Calcium aus dem Zytoplasma auf, wodurch die Atmungskettenaktivität gesteigert wird. Ein intrazelluläres Calciumsignal kann so indirekt zu einem Anstieg der ATP-Produktion, aber auch der vermehrten Entstehung *Reaktiver Sauerstoffspezies*, beitragen [166, 168].

#### 2.6.2. **cAMP (Cyclisches Adenosinmonophosphat)**

*Cyclisches Adenosinmonophosphat* (cAMP) wurde 1957 als erster sekundärer Botenstoff von Earl Sutherland entdeckt, der 1971 für diese Entdeckung einen Nobelpreis erhielt. Seither wurden sowohl der Mechanismus der cAMP-Synthese, des Abbaus als auch verschiedene Wirkmechanismen in der Zelle erforscht.

Das Enzym, das für die Katalyse von ATP zu cAMP verantwortlich ist, ist die ubiquitär in allen Zelltypen vorkommende Adenylylcyclase (AC). In humanen Zellen findet man zehn verschiedene Isoformen dieser Lyase, von denen  $\text{AC}_{1-9}$  membrangebunden sind, während die  $\text{AC}_{10}$  frei im Zytosol zu finden ist [172]. Die Aktivität der Adenylylcyclase wird durch die Bindung von Hormonen und anderen primären Botenstoffen an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren reguliert. Je nach Charakter des jeweiligen G-Proteins wirkt dieses hemmend oder aktivierend auf die Enzymfunktion der AC [173]. Wird die AC in Folge eines stimulierenden G-Proteins aktiviert, spaltet sie ATP zu cAMP und Pyrophosphat (Abbildung 11). Neben dieser G-Protein-vermittelten Aktivierung der AC kann auch die Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration zu einer Modulation der AC-Aktivität führen [174].



**Abbildung 11: Enzymatische Spaltung von ATP zu cAMP und Pyrophosphat durch die Adenylcyclase (AC).**

Quelle: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Adenylate\\_kinase.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Adenylate_kinase.png)

Gegenspieler der AC sind Phosphodiesterasen (PDE), die cAMP zu AMP abbauen. Gewebespezifisch treten elf Isoformen der PDE in humanen Zellen auf. Zu den Zielproteinen des sekundären Botenstoffes wiederum gehören CNG-(*cyclic nucleotide-gated*) Ionchannels, EPACs (*Exchange Protein directly Activated by cAMP*) sowie PKA (*Proteinkinase A*) [175, 176]. Durch die Aktivierung dieser Proteine hat cAMP indirekt einen Einfluss auf viele verschiedene Signalwege, die zelluläre Prozesse wie Proliferation, Apoptose und sogar die Immunantwort der Zellen regulieren [175, 177]. Neben diesen Prozessen kann cAMP über die Aktivierung der PKA aber auch Einfluss auf die Aktivität der in den Mitochondrien der Zelle lokalisierten Atmungskette nehmen, wodurch dieser sekundäre Botenstoff auch den Zellmetabolismus maßgeblich beeinflussen kann [178]. Ebenfalls über die Aktivierung der PKA führt ein cAMP-Anstieg zu der Mobilisierung sogenannter CREB- (*cAMP response element-binding protein*) Transkriptionsfaktoren. Dies führt zur Bindung von CREB an sogenannten "cAMP response element"-Sequenzen (CRE) der DNA und so zu einer verstärkten Expression bestimmter cAMP-abhängiger Gene [179].

Betrachtet man die Vielfalt der durch cAMP regulierten zellulären Prozesse, wird schnell klar, dass Zellen Mechanismen entwickelt haben müssen, die die jeweilige Wirkung des sekundären Botenstoffes auf irgendeine Art spezifizieren. Diese Spezifizierung wird über sogenannte AKAPs (*A-Kinase anchoring Protein*) gewährleistet, deren Aufgabe die Verankerung der jeweiligen ACs, PDEs sowie Effektorproteine in bestimmten subzellulären Bereichen ist. Durch diese lokale Begrenzung kann cAMP, trotz seiner freien Diffusionsfähigkeit, nur an bestimmten Orten innerhalb der Zelle auf seine dort anwesenden Effektoren wirken, wodurch sichergestellt werden kann, dass ein Anstieg an cAMP nur eine bestimmte zelluläre Reaktion zur Folge hat. [175, 180, 181] Über das so kontrollierte Zusammenspiel der ACs, PDEs sowie der jeweiligen Effektorproteine wird mit Hilfe von cAMP im Zytoplasma ein von außen kommendes Signal in Form eines primären Botenstoffes in eine zeitlich und räumlich exakt definierte intrazelluläre Reaktionsabfolge übersetzt. Fehler in dieser

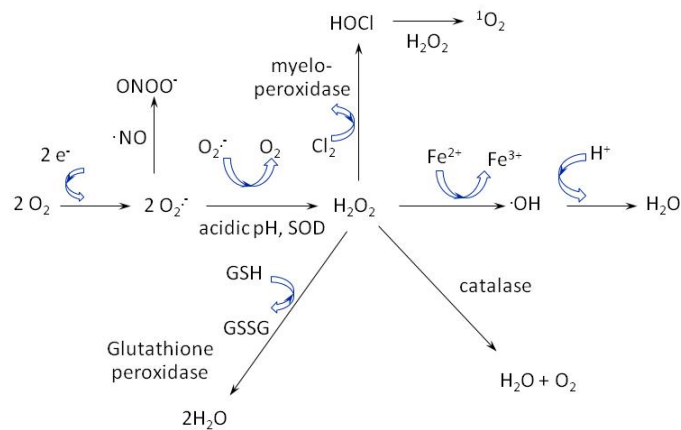
---

Translationskaskade können weitreichende pathophysiologische Folgen haben. So wird beispielsweise die Entstehung eines Katarakts (Linsentrübung) mit einer fehlerhaften Regulation der für den Erhalt der Linsentransparenz wichtigen Aquaporine über PKA in Verbindung gebracht [182]. *Marquette et al.* beschreiben weiterhin, dass die Inhibition des cAMP-Signalweges durch eine Überexpression von PDE4 bei der malignen Transformation von Melanozyten während der Entstehung eines Melanoms eine Rolle spielt [183]. Des Weiteren werden Fehlregulationen des cAMP-Signalings auch im Zusammenhang mit Erkrankungen des kardiovaskulären Systems sowie mit Typ 2 Diabetes mellitus beschrieben [181].

### 2.6.3. ROS (*Reaktive Sauerstoffspezies*)

Unter dem Sammelbegriff *Reaktive Sauerstoffspezies* (ROS) werden alle im Organismus vorkommenden hochreaktiven Sauerstoffderivate, wie Hyperoxide ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oder Hydroxyl-Radikale ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), zusammengefasst (Abbildung 12). Entstehen können ROS sowohl durch exogene Stimuli, wie beispielsweise Strahlung [11, 56], aber auch auf endogenem Weg als Nebenprodukt verschiedener metabolischer Aktivitäten [184]. Hauptproduzent der endogenen ROS sind die in den Mitochondrien lokalisierten Proteine der Atmungskette und hier vor allem Komplex I (*NADH-Dehydrogenase*) sowie Komplex III (*Cytochrom-C-Reduktase*). Ziel des Elektronentransports entlang der Atmungskette ist die Bildung von ATP unter Reduktion von  $\text{O}_2$  zu Wasser. Bei der Reduktion des Sauerstoffs kommt es jedoch zu einer Fehlerrate von 1-2%, wodurch z.B. Hydroxyl-Radikale entstehen können [185]. Zum Abbau der so entstandenen ROS haben Zellen ein antioxidatives System, zu dem Proteine wie die SOD (*Superoxid Dismutase*), Katalasen sowie *Glutathion* (GSH) gehören (Abbildung 12) [186-188]. Das Enzym SOD findet man sowohl in den Mitochondrien als auch im Zytoplasma der Zellen, wo es die Umwandlung von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxiden katalysiert. Die Wasserstoffperoxide werden im Folgenden von der Katalase zu Wasser und Sauerstoff umgewandelt, wodurch sie unschädlich gemacht werden.





**Abbildung 12: Überblick über die verschiedenen ROS sowie die zellulären Redoxmechanismen.**

Reaktive Sauerstoffspezies sind hochreaktive Sauerstoffderivate, deren Abbau in der Zelle aktiv über Proteine wie die Superoxid Dismutase (SOD), Katalasen oder Glutathion (GSH) reguliert wird. Quelle: [189]

Steigt die Konzentration an *Reaktiven Sauerstoffspezies* trotz der antioxidativen Enzyme über das physiologische Maß, gerät die Zelle unter oxidativen Stress, was schlussendlich zum Tod der betroffenen Zellen führen kann [190]. In den letzten Jahren wurde jedoch immer deutlicher, dass *Reaktive Sauerstoffspezies* neben ihrer toxischen Wirkung für den Organismus auch wichtige Funktionen in der Immunantwort, bei der Regulation vaskulärer Systeme sowie auf zellulärer Ebene übernehmen [189]. Im Falle einer Entzündung beispielsweise dient der durch Proteine der NOX-Familie (*NADPH Oxidasen*) hervorgerufene endogene Anstieg *Reaktiver Sauerstoffspezies* dazu, Pathogene abzutöten und dadurch den Körper zu schützen [191]. Auch auf zellulärer Ebene kann ein moderater ROS-Anstieg Einfluss auf verschiedene Signalkaskaden nehmen und so sogar das Überleben von Zellen sichern. Diese Wirkung der ROS beruht hierbei auf zwei intrazellulären Mechanismen. Zum einen kommt es durch eine ansteigende Konzentration *Reaktiver Sauerstoffspezies* im Zytoplasma der Zellen zu einer Veränderung des intrazellulären Redoxstatus, zum anderen können ROS durch oxidative Modulation von Aminosäureresten verschiedene Proteine nachhaltig verändern [184]. Eine solche ROS-induzierte Proteinmodulation kann zum Beispiel dazu führen, dass ein Cysteinrest oxidiert wird. Liegt dieser im aktiven Zentrum eines Enzyms, kann dessen Aktivität dadurch beeinflusst werden [192]. Auch können ROS durch Oxidationsereignisse an Aminosäureresten zur Bildung inter-, aber auch intramolekularer Verbindungen von Proteinen führen und so deren Dimerisierung oder Inaktivierung hervorrufen [184]. Interagieren ROS wiederum mit Transkriptionsfaktoren, können sie unter anderem zur Modulation der DNA-Bindestelle führen und so die Bindungsfähigkeit zwischen Transkriptionsfaktor und DNA modifizieren. So zeigten *Abate et al.* beispielsweise, dass die DNA-Bindekapazität des Heterodimers Fos-Jun von dem Redoxzustand eines einzigen konservierten Cysteinrests in der DNA-Bindedomäne abhängig ist [193]. ROS können somit durch die



---

Wechselwirkung mit Proteinen diese aktivieren, inhibieren und so Einfluss auf verschiedene Signalwege nehmen, aber auch eine veränderte Genexpression bewirken, wodurch langfristige zelluläre Veränderungen hervorrufen werden können. Welche Wirkung *Reaktive Sauerstoffspezies* in Zellen tatsächlich haben, scheint sowohl von der ROS-Spezies als auch konzentrationsabhängig zu sein [192, 194]. So können geringe  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen beispielsweise proliferationsfördernd sein, höhere Konzentrationen hingegen können die Proliferation temporär oder sogar vollständig hemmen [194].

Diese Beobachtung macht deutlich, wie wichtig es für Zellen, aber auch für den gesamten Körper ist, die Balance zwischen Entstehung und Abbau *Reaktiver Sauerstoffspezies* aufrecht zu erhalten und dass Behandlungen, die zu einer erhöhten Produktion von ROS führen sowohl zum Zelltod aber auch zu veränderten zellulären Reaktionen führen können.

---

## 2.7. Zielsetzung

Im Zuge einer Krebstherapie können Patienten verschiedenen Strahlenqualitäten ausgesetzt sein. Zur Reduktion des malignen Gewebes wird oftmals ausschließlich oder ergänzend zu einem operativen Eingriff eine Strahlentherapie mit ionisierender Strahlung durchgeführt [2]. Zur Schmerzlinderung, aber auch zur Unterstützung der ionisierenden Strahlentherapie ist eine Behandlung mit nahem Infrarot A (NIR) denkbar [1, 4]. Darüber hinaus kann die hier verwendete NIR-Dosis auch bei einem Spaziergang in der Sonne je nach Breitengrad schon nach 15-30 min erreicht werden, was eine kombinierte Applikation durchaus wahrscheinlich macht. In den frühen 50er Jahren zeigten Forscher sowohl in *Tradescantia* als auch in *Drosophila melanogaster*, dass NIR vor einer Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen das Auftreten chromosomaler Schäden erhöht [6-10]. Heselich et al. konnten 2012 belegen, dass die Vorbestrahlung mit NIR auch in murinen und humanen Zellen Einfluss auf die röntgeninduzierte Stressantwort hat. Neben einer verlangsamten Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) wiesen die kombiniert bestrahlten Säugerzellen im Vergleich zu den ausschließlich mit Röntgen bestrahlten eine erhöhte Anzahl *Mitotischer Katastrophen*, sowie eine veränderte Proliferationsrate auf. Des Weiteren wurde in den NIR-vorbestrahlten Zellen ein mehr als additiver Anstieg *Reaktiver Sauerstoffspezies* nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen gemessen [11]. Diese bisherigen Studien zeigen deutlich, dass die Kombination dieser beiden Strahlenarten die zelluläre Antwort auf eine Röntgenbestrahlung maßgeblich verändert. Von großem Interesse ist deshalb die Frage nach dem Einfluss einer NIR-Vorbestrahlung auf den Ausgang einer Strahlentherapie im Patienten.

Vor diesem Hintergrund war eines der Ziele dieser Arbeit die Etablierung eines *in vitro* Vollhautmodells zur Untersuchung der Relevanz dieser kombinierten Bestrahlung im Gewebe. Zwar ist das Ziel einer Strahlentherapie die ausschließliche Zerstörung des Tumors, eine Belastung des umliegenden gesunden Gewebes, vor allem der Haut, lässt sich hierbei jedoch nicht vermeiden. Auch durch Sonneneinstrahlung sowie durch medizinische Bestrahlung mit NIR sind in erster Linie die Zellen aller Hautschichten betroffen [54], weshalb dieses Gewebe für die Risikoabschätzung einer kombinierten Bestrahlung besonders gut geeignet ist. Mit Hilfe eines *in vitro* Vollhautmodells sollte deshalb analysiert werden, ob die Kombination aus NIR und therapierelevanten Röntgendosen auch in Zellen im Gewebeverbund eine veränderte Wirkung im Vergleich zur ausschließlichen Bestrahlung mit ionisierender Strahlung hat. Untersucht werden sollte hierbei der Einfluss auf die DSB-Reparatur, die Apoptoserate sowie die Proliferation der integrierten Zellen. Neben der Abschätzung der Relevanz für Zellen im Gewebeverbund war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Doppelbestrahlung näher zu charakterisieren. Unter Berücksichtigung der bereits bekannten Effekte der kombinierten Bestrahlung sollten zelluläre Parameter untersucht werden, die im

---

Zusammenhang mit solchen Effekten bereits beschrieben wurden. Hierfür sollte mittels Western-Blot- und Sandwich-ELISA-Analysen die Wirkung der Kombination aus NIR und Röntgenstrahlung auf verschiedene Proteine, bzw. posttranslationale Proteinmodifikationen, die mit der DNA-Reparatur sowie der zellulären Stressantwort assoziiert sind, untersucht werden. Des Weiteren sollten Expressionsanalysen verschiedener Gene, deren Produkte an der Entstehung *Mitotischer Katastrophen* beteiligt sein können, durchgeführt werden. Da für die Bestrahlung mit nahem Infrarot bereits ein starker Einfluss auf verschiedene Stoffwechselprozesse beschrieben wurde [11, 40-46], sollten Untersuchungen verschiedener sekundärer Botenstoffe Aufschluss über deren Beteiligung an der durch NIR hervorgerufenen Veränderung der zellulären Antwort auf ionisierender Strahlung geben. Um ein besseres Verständnis für die Wirkung der nahen Infrarotstrahlung zu erhalten, sollte zudem geklärt werden, ob die Zeit, in der die entsprechende Infrarotdosis appliziert wurde, für den Ausgang der zellulären Antwort eine Rolle spielt.

---

### 3. Material und Methoden

---

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Chemikalien und Puffer

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Standardchemikalien von Merck, Darmstadt, bzw. Carl Roth, Karlsruhe bezogen.

Chemikalien/ Puffer	Hersteller
4,6-Diamidin-2'-phenylindol (DAPI) [ $1\mu\text{g/ml}$ ]	Roche, Mannheim
Agarose	Peqlab, Erlangen
APS	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1).	Roth, Karlsruhe
Bradford-Lösung Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BioRad, München
Brom-Desoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim
DEPC	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
dNTP	Bioline, Luckenwalde
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Kaiser´s Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Lumi Light	Roche, Mannheim
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Mowiol/DABKO	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe
RAS Neg 50 (Tissue Tek)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (U.S.A.)
REAL Target Retrieval Solution (10x)	DAKO, Glostrup Dänemark
Roti® ImmunoBlock	Roth, Karlsruhe
Roti® Liquid Barrier Marker	Roth, Karlsruhe
Roti®-Safe	Roth, Karlsruhe

Saccharose	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween20	Roth, Karlsruhe
WesternBright Quantum HRP substrate	Advansta, Menlo Park (U.S.A.)
WesternBright Sirius HRP substrate	Advansta, Menlo Park (U.S.A.)

Puffer	Zusammensetzung
50xTAE-Puffer	242 g Tris-Base, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 mit dH <sub>2</sub> O auf 1000 ml auffüllen
1xTAE-Puffer	20 ml 50xTAE-Puffer Ad 980 ml dH <sub>2</sub> O
10x TBS-Puffer	160 g NaCl, 48,4 g Tris, MilliQ-H <sub>2</sub> O ad 2 L, pH 7,6
1x TBST-Puffer	100 mL 1x TBS, 0,1% Tween20, MilliQ-H <sub>2</sub> O ad 1 L
5x Laufpuffer	0,25 M Tris, 1,92 M Glycin in MilliQ-H <sub>2</sub> O
1x Laufpuffer	200 mL 5x Laufpuffer, 10 mL 10% SDS, MilliQ-H <sub>2</sub> O ad 1 L
5x Lämmli	300 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% SDS, 25% β-Mercaptoethanol, 50% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau
10x PBS	100 g NaCl 2 g KCl 11,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Ad 100 ml dH <sub>2</sub> O Mit 1 M NaOH auf pH 7,3 einstellen
1x PBS	50 ml 10x PBS Ad 500 ml dH <sub>2</sub> O
PBST	1x PBS/ 0,1 % Tween 20

PBS/EDTA	PBS-- + 1 g/ml EDTA Merck Darmstadt
PBS--	8 g NaCl 0,2 g KCl 0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O Mit 1 M NaOH auf pH 7,4 einstellen
4%iges Paraformaldehyd	16 g PFA Ad 400 ml 1x PBS Lösen durch pH 11 mit 10 M NaOH Mit 1 M HCL auf pH 7,3 einstellen
Blocklösung	PBST mit 1:10 Rotiblock und 0,1 % Triton (v/v)
Blotting- Puffer	200 mL 5x Laufpuffer, 200 mL MeOH, MilliQH <sub>2</sub> O ad 1 L
DNase-Puffer (10x)	50 mM Tris, 1 mM Mg <sup>2+</sup> , pH 7,8
Ponceau S-Färbelösung	0,1% Ponceau S in 5% Essigsäure
Proteinase-Puffer	100 mM Tris HCL, 50 Mm EDTA, ph 8,0
SDS-Sammelgel-Puffer	1,0 M Tris-HCl (pH 6,8)
SDS-Trenngel-Puffer	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
SOD-Zelllyse-Puffer	0,1 M Tris-HCl (pH 7,4), 0,5% Triton-X 100, 5 mM β-Mercaptoethanol, 0,1 mg/ml PMSF

### 3.1.2. Gelzusammensetzung Western Blot

12%iges SDS-Trenngel (10 mL)	3,4 mL dH <sub>2</sub> O, 4,0 mL 30% Acrylamide/Bis, 2,5 mL Trenngel-Puffer, 0,1 mL 10% SDS, 50 µL 10% APS, 5 µL TEMED <i>(Über das das Verhältnis zwischen dH<sub>2</sub>O und 30% Acrylamide/Bis kann die Prozentigkeit des Trenn- gels variiert werden.)</i>
SDS-Sammelgel (5 mL)	4,15 mL dH <sub>2</sub> O, 1,0 mL 30% Acrylamide/Bis, 0,76 mL Sammelgel-Puffer, 60 µL 10% SDS, 60 µL 10% APS, 6 µL TEMED

### 3.1.3. Zellen, Medien, Zusätze und Lösungen für die Zellkultur

Zellen	Ursprung
HaCaT (Zelllinie)	humane Keratinozyten
HT-29 (Zelllinie)	humanes Kolonkarzinom
NIH/3T3 (Zelllinie)	murine Fibroblasten
primäre Fibroblasten	Patientenbiopsie (human, Spender 71)
primäre Keratinozyten	Patientenbiopsie (human, Spender 71)

Fertig-Medien	Hersteller
DermaLife K Complete Medium	CellSystems, Troisdorf
DMEM	Gibco, Eggenstein
Ham's F12	Gibco, Eggenstein

Zusätze	Hersteller
L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate	Sigma Aldrich, Steinheim
Bovines Serumalbumin	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin
Hydrochortison	Sigma Aldrich, Steinheim
Insulin	Gibco, Eggenstein
L-Glutamin (200 mM)	Lonza Group AG, Basel
MEM-NEAA (Non Essencial Amino Acid) 100x	Gibco, Eggenstein
PBS	Gibco, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin (1000 U/ml; 1000µg/ml)	Lonza Group AG, Basel

Medium	Zusammensetzung
ALI-Medium (Air-Liquid-Interphase)	DMEM 30% Ham's F12 (v/v) 2% L-Glutamin (v/v) 2% BSA (v/v) 1% P/S (v/v) 1% ASP (v/v) 0,3% Insulin (v/v) 0,2 Hydrochortison (v/v)
Bestrahlungsmedium	DMEM carbonatfrei 10 mM HEPES
Fibroblastenmedium	DMEM 10% FCS (v/v) 2% L-Glutamin 1% P/S 1% ASP
HaCaT-Medium	DMEM 10% FCS (v/v) 1% L-Glutamin (v/v) 1% Pen/Strep (v/v)
HT-29-Medium	DMEM 5% FCS (v/v) 1% L-Glutamin (v/v) 1% NEAA (v/v) 1% Pen/Strep (v/v)
Kryomedium	DMEM 40% FCS (v/v) 10% DMSO 1% L-Glutamin (v/v) 0,1% Pen/Strep (v/v)
NIH/3T3-Medium	DMEM 10% FCS (v/v) 1% L-Glutamin (v/v) 1% NEAA (v/v) 1% Pen/Strep (v/v)



### 3.1.4. Enzyme, Längenstandards, sonstige Proteine, verwendete Kits

Enzyme, Proteine, Kits	Hersteller
Calcium Colorimetric Assay Kit	BioVision, BioCat, Heidelberg
Cyclic AMP XP <sup>®</sup> Chemiluminescent Assay Kit	Cell Signaling Technology, Leiden (NL)
DNase	Epicentre, Madison (U.S.A.)
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham (U.S.A.)
HiMark <sup>™</sup> Prestained HMW Protein Standard	Life Technologies, Carlsbad (U.S.A.)
Mitochondria/Cytosol Fractionation Kit for Cells	BioVision, BioCat, Heidelberg
PageRuler <sup>™</sup> Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
PathScan <sup>®</sup> Stress and Apoptosis Signaling Antibody Array Kit (Chemiluminescent Readout)	Cell Signaling Technology, Leiden (NL)
PCR (TopTaq <sup>®</sup> -PCR Kit)	Qiagen, Hilden
Proteinase K	Promega, Mannheim
Reverse Transkriptase (RevertAid <sup>™</sup> First Strand cDNA-Synthesis Kit)	Fermentas, St. Leon-Rot
Ribolock RNase-Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase	Epicentre, Madison (U.S.A.)
SOD Activity Assay Kit	BioVision, BioCat, Heidelberg
Trypsin	Merck, Darmstadt
TUNEL-Kit	Promega, Mannheim

### 3.1.5. Primäre Antikörper für Immunfluoreszenz

Epitop (Artikel-Nr.)	Hersteller	Verdünnung	Spezies
53BP1 (IHC-00001)	Bethyl/Biomol (USA)	1:500	rabbit
BrdU (G3G4)	DSHB (Kaufmann, S.J.)	1:500	mouse
H3K9me3 (ab8898)	Abcam, Cambridge (UK)	1:200	rabbit
Ki-67 (ab16667)	Abcam, Cambridge (UK)	1:500	rabbit
$\gamma$ H2AX Ser139 (05-636)	Merck Millipore, Darmstadt	1:400	mouse

### 3.1.6. Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz

Fluorophor	Hersteller	Verdünnung	Wirt anti Spezies
Alexa 488	Dianova, Hamburg	1:400	donkey anti goat
Alexa 594	Dianova, Hamburg	1:400	donkey anti rabbit
Cy3	Dianova, Hamburg	1:400	donkey anti mouse

### 3.1.7. Primäre Antikörper für Western Blot

Epitop (Artikel-Nr.)	Hersteller	Verdünnung	Spezies
CenpB (sc-22788)	Santa Cruz, Kalifornien, (USA)	1:1.000	rabbit
GAPDH HRP-gekoppelt (G9295)	Sigma-Aldrich, Steinheim	1:30.000	mouse
PARP-1 (46D11)	Cell Signaling Technology, Leiden (NL)	1:1.000	rabbit
pATM <i>Ser1981</i> (200-301-400)	Rockland/Biomol, Pennsylvania (USA)	1:1.000	mouse
pKAP1 <i>Ser824</i> (3640-1)	Epitomics, Burlingame (USA)	1:10.000	rabbit
$\alpha$ Tubulin (sc-8035)	Santa Cruz, Kalifornien, (USA)	1:1.000	mouse
H3 (ab1791)	Abcam, Cambridge (UK)	1:1.000	rabbit

### 3.1.8. Sekundäre Antikörper für Western Blot

Konjugat	Hersteller	Verdünnung	Wirt anti Spezies
HRP	Dianova, Hamburg	1:10.000	goat anti rabbit
HRP	Dianova, Hamburg	1:10.000	rabbit anti mouse

### 3.1.9. Primer (human)

Alle Primer wurden von Sigma Aldrich, Steinheim bezogen.

Gen	Produktgröße (bp)	Sequenz 5' → 3' fwd	Sequenz 3' → 5' rev	Annealing
<i>aurora B</i>	82	GGGAACCCACCCTTTGAGAG	CAGAAGCGGGGAACCTTAGGT	57°C
<i>cdc2</i>	238	CCGGGATCTACCATAACCCATT	AGCACATCCTGAAGACTGACTA	58°C
<i>cenpA</i>	255	GCCTGGCAGCAGAAGCATT	AAAGTCCAGACAGCATCGCA	58°C
<i>cenpB</i>	404	CGCAAGACCAACAAGCTGTC	CATAGACTGGTCTCGGTGGC	57°C
<i>cenpF</i>	694	AAAGAAGCCAACAAGCTGCG	TACTTGTTGACGCCTGGTC	57°C
<i>foxm1</i>	440	TGTGAATCTTCCTAGACCACC	CAAACATGTCGTGCAGGGAAA	58°C
<i>gapdh</i>	517	CCAGCCGAGCCACATCGCTC	TGACCTTGGCCAGGGGTGCT	57°C
<i>nek2</i>	490	CCAGAACTTCTTAATCTTCCATCCT	ATCACACACAGGATTAAGCCCA	54°C
<i>plk1</i>	525	CTTGTTAGTGGGCAAACCAC	GAATAGTCCACCCACTTGCT	58°C
<i>xrcc1</i>	392	ACCAAAACCAAGCCCACTCA	TATCGGATGAGTTCCGCCG	57°C

### 3.1.10. PathScan® – Liste der Proteine und posttranslationalen Modifikationen

#### Apoptose und Stress

Protein	Ziel	Modifikation
p44/42	Thr202/Tyr204	Phosphorylierung
Akt	Ser473	Phosphorylierung
Bad	Ser136	Phosphorylierung
HSP27	Ser82	Phosphorylierung
Smad2	Ser465/467	Phosphorylierung
p53	Ser15	Phosphorylierung
p38 MAPK	Thr180/Tyr182	Phosphorylierung
SAPK/JNK	Thr183/Tyr185	Phosphorylierung
PARP-1	Asp214	Cleavage
Caspase-3	Asp175	Cleavage
Caspase-7	Asp198	Cleavage

IκBα	Total	-
IκBα	Ser32/36	Phosphorylierung
Chk1	Ser345	Phosphorylierung
Chk2	Thr68	Phosphorylierung
eIF2α	Ser51	Phosphorylierung
TAK1	Ser412	Phosphorylierung
Survivin	Total	-
αTubulin	Total	-

### 3.1.11. Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage 1202 MP	Sartorius, Göttingen
Analysewaage LC 620 S	Sartorius, Göttingen
Autoklav VX- 150	Systec, Wettenberg
Axio Observer.D1	Zeiss, Göttingen
Axiovert 200M	Zeiss, Göttingen
Axiovert S100	Zeiss, Göttingen
Bestrahlungsapparatur	Werkstatt, TUD
Chemilumineszenz-Detektionsgerät	Vilber Lourmat, Eberhardzell
CO <sub>2</sub> -Inkubator Hera Cell 240	Thermo Scientific, Langenselbold
Cryostat MICROM, Typ HM 550	Thermo Scientific, Langenselbold
Cytofluor 2300	Millipore, Darmstadt
Digital-pH-Meter	Knick, Egelsbach
Fuchs-Rosenthal Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Gefahrstoffabzug 2-453-DAGD	Köttermann, Uetze-Hänigsen
Gelkämme 1,5 mm	Bio-Rad, München
Gelkammer 40 ml, 60 ml	Peqlab, Erlangen
Heizblock	Bioblock Scientific, Frenkendorf
Hydrosun® Strahler	Hydrosun Medizintechnik, Müllheim
Infinity 200	Tecan, Männedorf, Schweiz
Kühlschrank Liebherr Profiline 4°C	Liebherr, Ochsenhausen

Laborzentrifuge Z 233 MK-2	Hermle Labortechnik, Wehingen
Laminar Flow-Werkbank Hera guard	Thermo scientific, Dreieich
Laminar Flow-Werkbank Hera safe	Thermo scientific, Dreieich
Magnetrührer IKA-COMBIMAG RCT	Janke & Kunkel, Staufen
Mini Trans-Blot <sup>®</sup> Cell	Bio-Rad, München
Mini-PROTEAN <sup>®</sup> Tetra Cell Casting Stand	Bio-Rad, München
Mobiles Gassystem C206	Campingaz
ND 1000 Spectrophotometer (Nanodrop)	Peqlab, Erlangen
Orbitaler Rotationsschüttler	Werkstatt, TUD
Röntgenröhre MCN 165/796704	Philips, Eschborn
Rotlicht-Lampen IR 250 RH 250W	Philips, Eschborn
Spacer Plates With 1.5 mm Integrated Spacers	Bio-Rad, München
Spannungsgeber	Consort, Turnhout, Belgien
Spannungsgerät Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Synergy 4	BioTek, Winooski (U.S.A.)
Thermocycler Peqstar 2x Gradient	Peqlab, Erlangen
Tiefkühlschrank Hera freeze, -80°C, -20°C	Thermo scientific, Langenselbold
Tischzentrifuge	Biozym scientific, Oldendorf
Trockenschrank, 39°C	Memmert, Büchenbach
Vortex Reax2000	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	Köttermann, Uetze-Hänigsen
Zentrifuge 3K10, Rotor 11133	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zentrifuge Heraeus Biofuge Primo R, Rotor 7588	Thermo, Osterode

### 3.1.12. Programme

Programm	Hersteller
ChemiCapt 500	Vilber Lourmat, Eberhardzell
GraphPad Prism6 statistical software	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
ImageJ 1.48v	Wayne Raband, National Institutes of Health, USA
Leica LAS AF Lite	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar
Metafer 4 Metacyte	Metasystems, Altlußheim

### 3.1.13. Sonstige Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
6 cm Kulturschale	Sarstedt, Nümbrecht
10 cm Kulturschale	Sarstedt, Nümbrecht
96 Loch-Kulturplatte	Greiner, Frickenhausen
12 Loch-Kulturplatte	Greiner, Frickenhausen
25 cm <sup>2</sup> -Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
75 cm <sup>2</sup> -Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
125 cm <sup>2</sup> -Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
4565 Cryomold Biopsy	Sakura, Alphen aan den Rijn, (Niederlande)
Deckgläser 24 x 60 mm	Roth, Karlsruhe
Einweg-Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrocellulosemembran	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Greiner, Frickenhausen
SuperFrost® Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Glas Coverslips Ø 10, 12, 15 mm	VWR, Darmstadt

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Zellkultur mit Zelllinien

Alle zellkulturtechnischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Zellkulturbank durchgeführt. Die verwendeten Materialien wurden entweder steril gekauft oder laborintern sterilisiert. Medien, PBS/EDTA und Trypsin wurden vor Beginn der Arbeiten auf 37°C gebracht. Alle hier verwendeten Zelllinien wurden in einem Zellkulturinkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

#### Zellpassage zur Erhaltung der Zellkultur

Zur Erhaltung der Teilungsfähigkeit der Zellen werden diese bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80% passagiert. Hierfür wird das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen im Anschluss mit PBS/EDTA gewaschen, um etwaige Medienreste zu entfernen. Zum Ablösen der Zellen werden diese mit Trypsin/EDTA behandelt und für eine zelltypspezifische Zeit in den Zellkulturinkubator gestellt. Zum Abstoppen des enzymatischen Verdaus wird Medium im Verhältnis 1:2 hinzupipettiert und die Zellen zusätzlich unter Zuhilfenahme einer 10 ml-Pipette mechanisch vereinzelt. Um Reste des Enzyms zu entfernen, werden die Zellen in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wird in einer entsprechenden Menge frischen Zellkulturmediums aufgenommen und in der gewünschten Zelldichte in neue Zellkulturgefäße überführt. Da sowohl die Länge des Waschschritts zum Entfernen der Medienreste zu Beginn der Passage, die Zeit in der das Trypsin die Zellen vollständig vom Boden des Zellkulturgefäßes löst, als auch die Aussaatdichte zelltypspezifisch variieren, wurden diese im Folgenden tabellarisch zusammengefasst:

Zelllinie	Volumina / Inkubationszeiten		Verdünnung (Aussaat)
	PBS/EDTA (Waschen)	Trypsin/EDTA (Ablösen)	
HaCaT	5 ml / 5 min	3 ml / 7 min	1:3
HT-29	5 ml / 1 min	3 ml / 1 min	1:5
NIH/3T3	5 ml / 3 min	3 ml / 5 min	1:10

#### Kryokultivierung

Um Zelllinien in möglichst niedrigen Passagezahlen zur Verfügung zu haben, können sogenannte Kryokulturen angelegt werden. Diese ermöglichen die langfristige Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff und dadurch den Erhalt der Zelllinie. Zur Herstellung einer solchen Kryokultur wird eine Zellsuspension mit einem Zelltiter von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml in Kryomedium angesetzt. Je 1 ml dieser Zellsuspension wird in ein hierfür vorgesehenes Kryovial pipettiert. Mit einer Kühlrate von 1°C/min werden diese Kulturen eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

---

## Inkulturnahme kryokonservierter Zellen

Zum Auftauen der Zellen aus der Kryokultur werden diese in einem Wasserbad bei 37°C zügig aufgetaut und zur Verdünnung des Kryomediums in 10 ml frischem Kulturmedium aufgenommen. In einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen werden die Zellen dann 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wird im Anschluss in eine T25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche pipettiert. Nach ca. 12 Stunden wird ein Medienwechsel durchgeführt, um tote Zellen aus der Kultur zu entfernen. Anschließend werden die Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 80% weiterkultiviert und dann das erste Mal passagiert. Bevor diese Zellen für Versuche genutzt wurden, wurden sie mindestens 2-mal passagiert.

### 3.2.2. Kultivierung humaner Vollhautmodelle

#### Isolation primärer Fibroblasten und Keratinozyten

Die hier verwendeten primären dermalen Zellen wurden am Universitätsklinikum Frankfurt am Main aus *Präputien* isoliert, die während Beschneidungen von Kindern bis 7 Jahren operativ entfernt wurden. Alle hier durchgeführten Arbeiten mit diesen Zellen wurden gemäß der Deklaration von Helsinki und mit der Zustimmung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Frankfurt am Main (Local Ethics Commission/institutional review board (IRB)) durchgeführt.

Vor Beginn der Zellisolation aus den frischen Biopsien werden diese über einen Zeitraum von 6 h mit einer 2%igen Penicillin/Streptomycin-PBS<sup>++</sup>-Lösung gewaschen. In diesem Zeitraum muss die Lösung regelmäßig gewechselt werden. Nach diesem Waschschrift wird die Biopsie in etwa 0,5-0,8 cm große Stücke zerschnitten und zur Trennung von Epidermis und Dermis für ca. 14-16 h in 10 ml Thermolysin (70 U/ml) bei 4°C inkubiert. Zur vollständigen Trennung wird die Epidermis nach dieser Inkubationszeit mit sterilen Pinzetten von der Dermis abgezogen und für 20 min bei 37°C in 10-20 ml Trypsin/EDTA inkubiert, wodurch die epidermalen Zellen von der *Extrazellulären Matrix* getrennt und vereinzelt werden. Nach der Inkubation wird einmal kräftig geschüttelt, um den Trypsinverdau mechanisch zu unterstützen. Die enzymatische Trennung wird durch Zugabe von 10-20 ml fötalem Kälberserum abgestoppt. Die so gewonnene Zellsuspension wird im Anschluss durch ein Zellsieb (Porengröße 70 µm) gegeben und bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wird in DermaLife K Complete-Medium resuspendiert und mit einem Zelltiter von  $2 \cdot 10^6$  Zellen in 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen ausgesät. Einen Tag nach der Einsaat wird ein Medienwechsel (25 ml/T175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche) vorgenommen. Die Keratinozytenkulturen werden in einem Zellkulturinkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für die Isolation der Fibroblasten aus der Dermis werden die dermalen Stücke der Biopsie im Anschluss an den Thermolysinverdau mechanisch zerkleinert und in einer 0,25%igen Collagenase I-Lösung für 2-4 h bei 37°C im Wasserbad unter regelmäßigem, kräftigem Schütteln inkubiert. Während dieser Inkubationszeit müssen die dermalen Stücke regelmäßig mit Hilfe einer Pipette resuspendiert werden. Die Zellsuspension wird nach dem Verdau durch ein Zellsieb (Porengröße 70 µm) gefiltert und 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das so entstandene Pellet wird in Fibroblastenmedium resuspendiert und  $1 \cdot 10^6$  Zellen pro T175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche zur Erhaltung ausgesät. Medienwechsel werden nach einem Tag und dann alle zwei Tage durchgeführt (25 ml/T175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche). Die Kultivierung der primären Fibroblasten erfolgt in einem Zellkulturinkubator mit 37°C, 7,5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit.



---

## Kultivierung primärer dermaler Zellen

### *Fibroblasten*

Für die Passage der primären Fibroblasten wird das verbrauchte Medium entfernt und die Zellen anschließend mit 10 ml PBS<sup>–</sup>(RT) gewaschen. Zum Ablösen der Zellen werden diese 7 min bei 37°C mit 5 ml Trypsin behandelt. Haben sich alle Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, wird der Trypsinverdau mit warmem FCS-haltigem Fibroblastenmedium (1:1) abgestoppt und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren zusätzlich mechanisch vereinzelt. Die so entstandene Zellsuspension wird in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 4-6 ml Medium resuspendiert und die Zellen mit einem Zelltiter von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/Flasche in neue T175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen überführt. Bis zur nächsten Passage wird das Medium alle 2 Tage gewechselt. Die primären Fibroblasten werden in einem Zellkulturinkubator mit 37°C, 7,5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

### *Keratinocyten*

Da Keratinozyten in konfluenten Monolayerkulturen schnell differenzieren und dadurch ihre Teilungsfähigkeit verlieren, ist es besonders bei diesem Zelltyp wichtig, die Zellen rechtzeitig zu passagieren. Hat die Kultur eine ca. 70%ige Konfluenz erreicht, wird das alte Medium abgesaugt und etwaige Medienreste durch Waschen mit 10 ml warmem PBS<sup>–</sup> entfernt. Um die Keratinozyten vom Flaschenboden abzulösen, werden die Zellen 7 min mit 5 ml Trypsin bei 37°C inkubiert. Da das Keratinozytenmedium kein Serum enthält, werden zum Abstoppen des Trypsinverdaues 5 ml 100%igen FCS verwendet. Die Zellen werden mit Hilfe einer 5 ml-Pipette zusätzlich mechanisch vereinzelt, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird in frischem DermaLife K Complete-Medium resuspendiert und je  $1 \cdot 10^6$  Zellen werden für die Erhaltung in eine neue T175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche pipettiert. Bis zur nächsten Passage wird das Medium alle 2 Tage gewechselt. Die Keratinozyten werden in einem Zellkulturinkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

## Kryokonservierung und Auftauen primärer dermaler Zellen

### *Kryokonservierung*

Besonders bei primären Zellen ist es wichtig, diese in möglichst niedrigen Passagezahlen zu erhalten, weshalb man meist bereits bei der ersten Passage nach der Isolation Kryokulturen anlegt. Haben die Zellen eine ca. 70-80%ige Konfluenz in den Kulturflaschen erreicht, werden die Zellen wie zur Passage vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei 1000 rpm wird das Zellpellet im jeweils zelltypspezifischen Kryomedium mit einem Zelltiter von  $3 \cdot 10^6$  Zellen/ml resuspendiert. 1 ml dieser Zellsuspension wird in ein Kryovial pipettiert und dieses mit einer Kühlrate von 1°C/min eingefroren. Anschließend werden die Kryovials zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

### *Auftauen von Kryokulturen*

Nach Entnahme eines Kryovials aus dem Stickstofftank wird dieses im Wasserbad möglichst schnell aufgetaut. Die aufgetauten Zellen werden in 5 ml frischem zelltypspezifischem Medium aufgenommen und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Während der Zentrifugation werden drei T175 cm<sup>2</sup>-

---

Zellkulturflaschen mit je 25 ml des entsprechenden Mediums befüllt. Das Zellpellet wird nach der Zentrifugation in 3 ml des spezifischen Kulturmediums aufgenommen und auf die vorbereiteten Zellkulturflaschen aufgeteilt. 24 Stunden nach dem Auftauen wird ein Medienwechsel durchgeführt und anschließend während der gesamten Kultivierungszeit alle 2 Tage ein Medienwechsel vorgenommen. Wurden Fibroblasten aufgetaut, werden diese im Folgenden bei 37°C, 7,5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert, wohingegen Keratinozyten bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert werden.

### **Herstellen der humanen Vollhautmodelle**

Die Kultivierung eines humanen Vollhautmodells gliedert sich in 3 Phasen (Abbildung 13):

1. Fibroblastenphase (2 Wochen)
2. Keratinozytenphase (1 Woche)
3. Luft-Flüssigkeitsphase (1-3 Wochen)

#### ***Fibroblastenphase***

Zur Vorbereitung dieser Phase werden etwa 5 Tage vor Beginn der Herstellung der humanen Vollhautmodelle Kryokulturen von Fibroblasten eines bestimmten Spenders aufgetaut und die Zellen in Kultur genommen (s. oben).

Die tatsächliche Fibroblastenphase beginnt mit der Einsaat der Fibroblasten in MatriDerm®, einer käuflich zu erwerbenden Protein-Matrix, bestehend aus Kollagen und Elastin. Für diese Einsaat werden die Zellen mit Hilfe eines Trypsinverdaus aus den Zellkulturflaschen gelöst und nach Abstoppen des enzymatischen Verdaus in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der 10minütigen Zentrifugation bei 1000 rpm wird das Pellet in Fibroblastenmedium resuspendiert. Um möglicherweise nicht vereinzelte Zellen aus dieser Zellsuspension zu entfernen, wird diese durch ein Zellsieb gefiltert und auf einen Zelltitert von  $4 \cdot 10^6$  Zellen/ml in Fibroblastenmedium eingestellt. Da MatriDerm® als rechteckiger Bogen vorliegt, werden mit Hilfe einer Stanze etwa 200 mm<sup>2</sup> große runde Stücke aus diesem Bogen gestanzt. Diese Größe und Form entspricht der einer Kavität einer 24-Lochplatte. Nach dem Ausstanzen werden die Matrixstücke in die Kavitäten der 24-Lochplatte gelegt und mit 1 ml Fibroblastenmedium getränkt. Nach ca. 15 min wird das Medium entfernt und je 100 µl der  $4 \cdot 10^6$  Zellen/ml Zellsuspension auf je ein Matrixstück pipettiert. Die so aufgebraachten Zellen werden nun für ca. 4 Stunden bei 37°C, 7,5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit im Zellkulturinkubator kultiviert, sodass sie in die Matrix einwandern können und in dieser adhären. Nach diesen 4 Stunden wird pro Kavität 1 ml des Fibroblastenkulturmediums hinzupipettiert und die Zellen anschließend weiter bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Während dieser zweiwöchigen Phase muss das Medium täglich gewechselt werden.

#### ***Keratinozytenphase***

Ca. 7 Tage vor Beginn dieser Phase werden Keratinozyten aufgetaut. Hierbei kann es sich sowohl um Zellen desselben Spenders, wie die Fibroblasten, als auch um Zellen eines anderen Spenders handeln. Am Tag der Keratinozyteneinsaat werden die Zellen mit Hilfe von Trypsin vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst, das Trypsin wird mit 100%igem FCS abgestoppt und die Zellen für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in DermaLife K Complete Medium resuspendiert und durch ein Zellsieb gefiltert. Es wird ein Zelltitert von  $4 \cdot 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Von den mit Fibroblasten

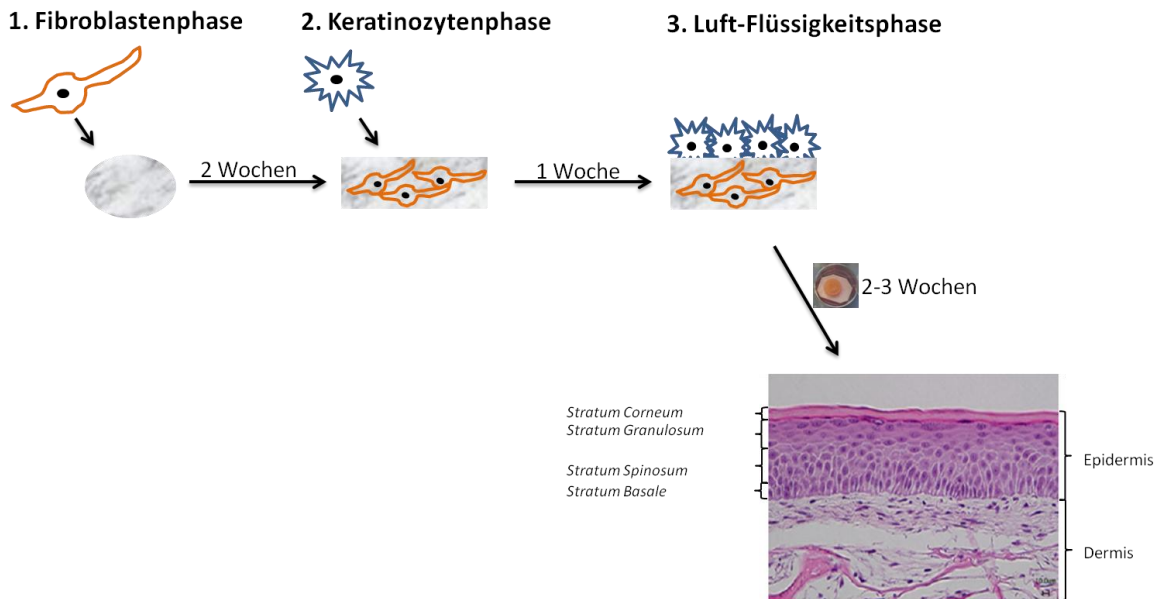
---

bewachsenen Matrixstücken wird nun das Medium abgezogen. Anschließend werden je 100 µl der Keratinozytensuspension vorsichtig auf diese Kulturen aufpipettiert. Damit die Keratinozyten auf der Matrix festwachsen können, werden die Kulturen für 4 Stunden im Zellkulturinkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach dieser Zeit wird vorsichtig 1 ml DermaLife K Complete-Medium hinzupipettiert. Die Kulturen werden dann für 7 Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert, wobei täglich ein Medienwechsel durchgeführt werden muss.

### ***Luft-Flüssigkeitsphase***

Ziel dieser Phase ist die Differenzierung der auf der Matrix sitzenden Keratinozyten, die zur Ausbildung aller Schichten der Epidermis führt. Zur Vorbereitung werden Whatman-Paper auf die Größe der Kavitäten einer 6 Lochplatte zugeschnitten und diese Zuschnitte autoklaviert. Hierbei wird pro Vollhautmodell jeweils ein solcher Zuschnitt benötigt. Zusätzlich werden Aluminiumfüßchen sterilisiert.

Zum Anheben der Fibroblasten/Keratinozyten-Kulturen in der MatriDerm®-Proteinmatrix an die Luft-Flüssigkeitsphasengrenze werden Aluminiumfüßchen in die Kavität der 6 Lochplatte gelegt und auf diese je ein Stück autoklaviertes Whatman-Paper platziert. Die so vorbereiteten Kavitäten werden nun mit je 5,5 ml des für diese Phase benötigten ALI-Mediums gefüllt. Das Whatman-Paper saugt sich voll und die bisher submers kultivierten Matrixstücke werden nun möglichst mittig oben auf das Papier gelegt. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass die Seite der Matrixkultur, auf die die Keratinozyten aufgebracht wurde, nach oben zeigt. Durch diese Art der Kultivierung wird das Modell von unten nach wie vor mit Medium versorgt, kann aber von oben her trocknen, wodurch die Keratinozyten den Impuls bekommen, mit der Differenzierung zu beginnen. In dieser Kultivierungsphase wird nur noch jeden zweiten Tag ein Medienwechsel durchgeführt, da die Fibroblasten des Modells Signale in das Kulturmedium abgeben, die neben der Trockenheit an der Oberfläche für die Differenzierung des Vollhautmodells wichtig sind. Die Kulturen werden nun bei 37°C, 7,5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit weiterkultiviert. Während dieser Phase werden alle 7 Tage Modelle für morphologische Untersuchungen fixiert und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Haben sich alle Schichten der Epidermis ausgebildet, können die fertigen Modelle für Versuche verwendet werden.



**Abbildung 13: Zeitschema der Herstellung humaner Vollhautmodelle.**

Die Kultivierung humaner Vollhautmodelle beginnt mit der Einsaat primärer Fibroblasten. Diese wandern in die Matrix ein, proliferieren und exprimieren selbstständig Proteine der extrazellulären Matrix der Dermis. Zwei Wochen nach der Fibroblasteneinsaat werden Keratinozyten auf die Matrix aufgebracht. Nach einer Woche bilden diese Zellen einen dichten Monolayer auf der Matrixoberfläche. Die Kulturen werden im Folgenden an die Luft-Flüssigkeitsgrenze gehoben, wodurch die Differenzierung der Keratinozyten induziert wird. Nach etwa 2-3 Wochen haben sich alle Schichten der Epidermis gebildet. Quelle H/E-Färbung: [26]

### 3.2.3. Bestrahlungen

#### Bestrahlung mit wassergefiltertem nahem Infrarot (NearInfraRed, NIR 0,6-1,4 $\mu\text{m}$ )

Für die Bestrahlung mit wassergefiltertem Infrarot wurden im Zuge dieser Arbeit zwei verschiedene Aufbauten verwendet. Je nach Fragestellung wurde entweder mit der laboreigenen Apparatur (NIR) oder dem Infrarotstrahler der Firma Hydrosun<sup>®</sup> Medizintechnik GmbH (wIRA) bestrahlt (Abbildung 14).

Als Strahlenquelle der laboreigenen Apparatur dienen zwei Infrarotlampen der Firma Philips (250 W, IR250RH). Das Wellenlängenspektrum dieser Lampen beinhaltet das gesamte Infrarotspektrum, sowie einen Teil des sichtbaren Lichtes (Abbildung 14, A). Um die Strahlung auf den hier verwendeten Wellenlängenbereich von 600 bis 1.400 nm zu limitieren, wird das Licht durch einen gekühlten Wasserfilter (20 mm) appliziert, dessen Boden aus 4 mm dickem gefrorenem Glas besteht und somit ein homogenes Bestrahlungsfeld gewährleistet. Durch die kontinuierliche Kühlung des Wassers wird sichergestellt, dass die Bestrahlung keine direkten thermischen Effekte hervorruft. Unterhalb des Wasserfilters befindet sich die Probenebene, in der ein Leistungsfluss von 18 mW/cm<sup>2</sup> gemessen wurde.

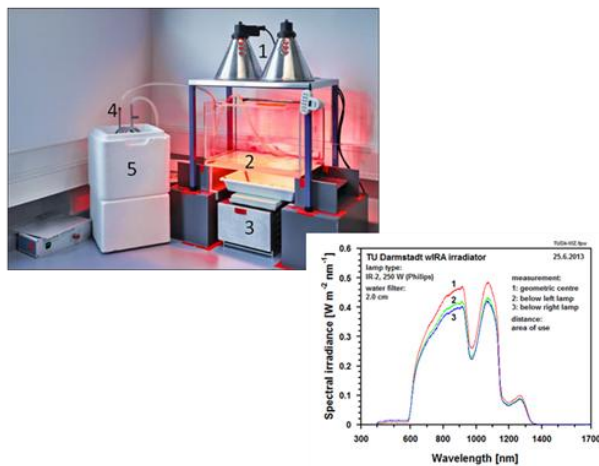
Der Aufbau des Hydrosun<sup>®</sup>-Strahlers beruht auf demselben Prinzip wie der der laboreigenen Apparatur (Abbildung 14, B). Jedoch wird hier als Strahlenquelle eine Halogenlampe verwendet, die eine Leistung von 750 W hat. Dieser Lampe ist ein 7 mm dicker Wasserfilter vorgelagert, der auch hier dazu dient, Wellenlängen größer 1,4  $\mu\text{m}$  zu absorbieren. Da der Halogenstrahler das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichtes abdeckt, wurde zur Limitierung der Wellenlängen auf den roten Anteil des

sichtbaren Lichtes zusätzlich ein Sperrfilter (Langpassfilter 590 nm) vor den Wasserfilter montiert. Bei einem Abstand von 32,5 cm zwischen Strahler und Probe beträgt der Leistungsfluss 200 mW/cm<sup>2</sup>. Da das Bestrahlungsfeld des Hydrosun®-Strahlers in sich nicht homogen ist, rotieren die Proben während der gesamten Bestrahlungsdauer auf einem Orbital-Rotationsschüttler, um so eine möglichst gleichmäßige Bestrahlung zu erreichen.

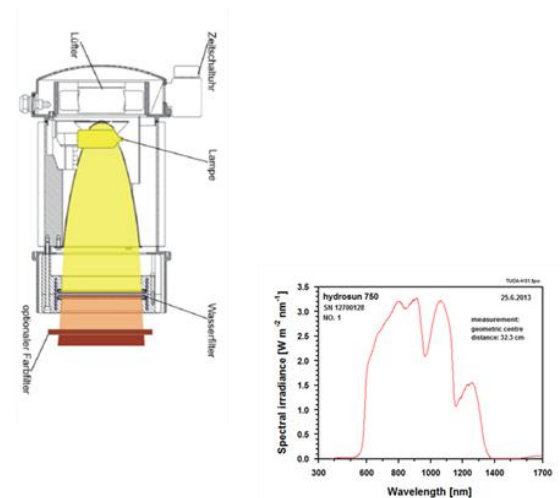
Bei beiden Apparaturen wird die zu applizierende Infrarot A-Dosis über die Dauer der Bestrahlung reguliert und ist abhängig von der Leistung der jeweils verwendeten Lichtquelle, wodurch sich für dieselbe Dosis verschiedene Bestrahlungszeiten ergeben. Die hier verwendete Dosis von 360 kJ/m<sup>2</sup> wird bei der laboreigenen Apparatur durch eine Bestrahlungszeit von 35 min erreicht. Bei den oben genannten Einstellungen benötigt man mit dem Hydrosun®-Strahler hingegen nur 3 min.

Vor Beginn der Bestrahlung wird das Kulturmedium gegen carbonatfreies Bestrahlungsmedium (DMEM, -HCO<sub>3</sub>, +10 mM HEPES, pH 7,2) ausgetauscht. Anschließend werden die Proben in das Bestrahlungsfeld gestellt und unter Wasserkühlung bestrahlt. Während der gesamten Bestrahlungszeit wird die Temperatur des Mediums kontrolliert, um sicher zu stellen, dass dieses konstant bei Raumtemperatur bleibt. Nach der jeweiligen Bestrahlungszeit wird das Bestrahlungsmedium wiederum gegen vorgewärmtes Kulturmedium getauscht und die Proben bis zur Weiterverarbeitung unter den benötigten Kulturbedingungen im Inkubator weiterkultiviert.

**A**



**B**



**Abbildung 14:** Darstellung der laboreigenen Bestrahlungsapparatur (A) sowie eines Querschnitts des Hydrosun®-Strahlers (B) mit dessen jeweiligem Bestrahlungsspektrum.

## Röntgenbestrahlung

Die Röntgenbestrahlung wird mit einer Philips MCN 165/796704 Röntgenröhre durchgeführt, deren Anode aus Wolfram besteht. Der gerichtete Austritt der ionisierenden Strahlung wird über ein oberhalb der Quelle liegendes Berylliumfenster erreicht. Die Proben werden für die Bestrahlung in einem definierten Bestrahlungsfeld auf einem 1 mm dicken Alublech 39 cm über dem Austrittsfenster platziert. Für die hier durchgeführten Bestrahlungen wurde die Röhre bei einer Spannung von 90 kV und einer Stromstärke von 33,7 mA betrieben. Die jeweilige Röntgendosis wird über die

---

Bestrahlungsdauer geregelt, wobei unter den gewählten Einstellungen 2,7638 Gy/min appliziert werden. Da die Bestrahlungszeiten auch bei sehr hohen Dosen gering sind, kann im jeweiligen Kulturmedium bestrahlt werden.

Für die Bestrahlung der Hautmodelle wurden diese von den Metallfüßchen, die sie an der Luft-Flüssigkeitgrenze halten, heruntergenommen, um mögliche Veränderungen der Dosis durch Ionisationsereignisse im Metall zu verhindern. Zellen, die auf Glas-Coverslips kultiviert wurden, wurden nur mit der Hälfte der gewünschten Dosis bestrahlt, da es durch die Wechselwirkung der Strahlung mit dem Glas zu einer Verdopplung der Dosis kommt [195].

### **3.2.4. Fixierungen für histochemische Analysen**

#### **Zellen auf Coverslips**

Zur Fixierung der auf Coverslips gewachsenen Zellkulturen wird das Medium entfernt. Die Zellen werden kurz mit PBS gewaschen und anschließend 10 min mit 4%igem PFA inkubiert. Nach diesem Fixierungsschritt werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um Fixativreste zu entfernen. Im Anschluss können die Zellen entweder direkt gefärbt oder bis zur Weiterverarbeitung in PBS bei 4°C gelagert werden.

#### **Fixierung humaner Hautmodelle**

Zur Untersuchung der Morphologie sowie einzelner Zellen in den hier verwendeten humanen Hautmodellen wurden Gefrierschnitte angefertigt. Bevor die Modelle geschnitten werden können, müssen sie mit 4%igem PFA fixiert werden. Hierfür werden die Modelle, mit der Epidermis nach unten, 10 min in PBS gewaschen und anschließend 10 min in 4%igem PFA inkubiert. Um Reste des Fixativs zu entfernen, werden die Hautmodelle anschließend dreimal mit PBS gewaschen.

### **3.2.5. Herstellung von Gefrierschnitten**

#### **Anfertigen von Gefrierschnitten**

Um die Bildung großer Eiskristalle beim Einfriervorgang zu verhindern, werden die fixierten Hautmodelle vor dem Schneiden über Nacht in 25%iger Saccharose inkubiert. Die so behandelten Gewebestücke werden in Kryoförmchen überführt und mit TissueTec überschichtet. Zum Einfrieren werden die Kryoförmchen in den -21°C kalten Kryostat gelegt. Ist das TissueTec komplett durchgefroren, werden die Hautmodelle mit einer Rasierklinge in der Mitte durchgeschnitten und die beiden Hälften mit einem Tropfen TissueTec aneinander gefroren. Anschließend wird das Gewebe ebenfalls mit TissueTec auf dem Objektisch fixiert. Im Folgenden werden 12 µm dünne Gewebsschnitte angefertigt. Diese Feinschnitte werden mit Hilfe von SuperFrost® Plus-Objektträgern vom Messer aufgenommen und bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.



---

### 3.2.6. Immunhistologische Methoden

#### Kernfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

Der Kernfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol interkaliert in der kleinen Furche der DNA in besonders AT-reichen Sequenzen, wodurch er sich sehr gut eignet, Kernmorphologien mikroskopisch zu untersuchen. Für die Färbung werden fixierte Zellen 10 min und fixierte humane Vollhautmodellschnitte 30 min mit DAPI inkubiert. Anschließend wird kurz mit PBS und, um Salzurückstände vor dem Eindecken zu entfernen, im Anschluss kurz mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Färbung wird dann unter Lichtausschluss getrocknet und mit Kaiser's Glycerin Gelatine oder Mowiol/DABCO eingedeckt.

#### Antikörperfärbung adhärenter Monolayerkulturen

Zunächst wird der primäre Antikörper in seiner spezifischen Verdünnung in Blocklösung (PBST/0,2% Triton X-100/1:10 RotiBlock) angesetzt. Je 60 µl der Antikörperlösung pro Coverslip werden auf ein Stück Parafilm in einer feuchten Kammer pipettiert. Die Coverslips werden mit den Zellen nach unten auf diesem Tropfen platziert und 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper werden die Coverslips anschließend dreimal für 10 min mit PBST gewaschen. Der sekundäre Antikörper wird 1:400 in Blocklösung (PBST/0,2% Triton X-100/1:10 RotiBlock) angesetzt. Von dieser Lösung werden ebenfalls je 60 µl/Coverslip auf ein Stück Parafilm in der feuchten Kammer pipettiert. Nach dem Waschen werden die Coverslips mit derjenigen Seite, auf der sich die Zellen befinden, nach unten, auf diesen Tropfen gelegt. Die Inkubationszeit für den Zweitantikörper beträgt 60 min und wird bei Raumtemperatur durchgeführt. Im Anschluss werden die Coverslips dreimal mit PBST gewaschen und die Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt. Bevor die Coverslips mit Kaisers Glycerin Gelatine eingedeckt werden können, werden diese im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet. Die so eingedeckten Färbungen werden über Nacht im Dunklen bei Raumtemperatur getrocknet.

#### Antikörperfärbung auf Schnitten der Vollhautmodelle

Bevor mit der Antikörperfärbung auf den Kryoschnitten der humanen Hautmodelle begonnen werden kann, müssen die Gefrierschnitte für 30 min bei 37°C auf einem Heizblock geglättet werden. Zur Demaskierung der Antikörper-Epitope werden die Schnitte 1 h bei 98°C in 1x Citratpuffer gekocht. Nach dem Kochen müssen die Objektträger 15 min im Citratpuffer abkühlen. Anschließend werden die Objektträger einmal kurz in PBS gespült und dann für 10 min mit PBS gewaschen. Damit die Antikörperlösung nicht von den Objektträgern herunterläuft, werden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet. Um das Austrocknen während der Antikörperinkubationszeit zu verhindern, werden die Objektträger dann in eine feuchte Kammer gelegt. Die primären Antikörper werden nun in der entsprechenden Verdünnung in Blocklösung (PBST/0,2% Triton X-100/1:10 RotiBlock) angesetzt und 200 µl dieser Lösung auf die Schnitte pipettiert. Die fünfständige Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgt bei 37°C. Im Anschluss werden die Objektträger zweimal 10 min mit PBST gewaschen und über Nacht in PBS bei 4°C gelagert. Die sekundären Antikörper werden 1:400 in Blocklösung (PBST/0,2% Triton X-100/1:10 RotiBlock) verdünnt und nach erneutem Umranden mit dem Fettstift auf die Schnitte pipettiert. Die Inkubation erfolgt für 2,5 h bei RT in einer dunklen,

---

feuchten Kammer. Nach dieser Zeit werden die Schnitte zweimal 10 min mit PBST und anschließend einmal kurz in PBS gewaschen. Für die Kernfärbung werden die Gewebeschnitte 30 min mit DAPI behandelt. Um die Reste des Kernfarbstoffes zu entfernen, wird zweimal mit PBS gewaschen. Danach werden die Objektträger einmal kurz in dH<sub>2</sub>O getunkt und in nebelfeuchtem Zustand mit Mowiol/DABCO eingedeckt. Zum Trocknen des Eindeckmediums werden die Objektträger über Nacht im Dunklen bei Raumtemperatur gelagert.

### **Detektion apoptotischer Zellen in humanen Vollhautmodellen mittels TUNEL-Methode**

Während des programmierten Zelltods (Apoptose) wird die DNA durch bestimmte Endonukleasen fragmentiert, wobei freie Hydroxygruppen entstehen. Dies wird sich bei der hier angewandten TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*)-Methode dadurch zu Nutze gemacht, dass terminale Desoxyribonukleotidyltransferasen (TdT) an eben diese freien 3'-Enden der fragmentierten DNA fluoreszenzmarkierte Nukleotide anhängen. Durch die Fluoreszenzmarkierung sind somit apoptotische Zellen im Mikroskop deutlich von lebenden Zellen zu unterscheiden. Bevor mit der Durchführung des TUNEL-Assays nach Herstellerangaben begonnen werden kann, müssen die FTSM-Kryoschnitte für 30 min auf dem Heizblock geglättet werden. Nach einer kurzen Abkühlphase werden die Schnitte für 7 min in 0,2% TritonX-100/PBS permeabilisiert und anschließend zweimal 5 min in PBS gewaschen. Nach einer zehnminütigen Inkubation mit dem im Kit enthaltenen Equilibrierungspuffer bei RT, werden pro Objektträger 150 µl der TUNEL-Färbelösung (2%TdT, 1:10 fluoreszenzmarkierter Nukleotide/Equilibrierungspuffer) auf die Schnitte pipettiert. Die Inkubation mit der Färbelösung erfolgt 60 min bei 37°C im Dunklen. Zum Abstoppen der TdT werden die Schnitte anschließend mit 2x SSC behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS werden die Schnitte für 15 min mit DAPI behandelt. Im Anschluss an die Kernfärbung werden die Objektträger kurz mit PBS und anschließend mit VE gewaschen. Nach dem Eindecken mit Mowiol/DABCO werden die Objektträger unter Lichtausschluss über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

### **3.2.7. Lebendfärbung**

#### **ROS-Level-Bestimmung mittels 2',7'-Dichlorfluoresceindiacetat (DCFDA)**

Reagiert reduziertes DCFDA, ein membrangängiger Farbstoff, der in lebende Zellen eindringen kann, im Inneren einer Zelle mit *Reaktiven Sauerstoffspezies* (ROS), wird es oxidiert und durch spezifische Esterasen von den Acetatgruppen abgespalten, wodurch es zu fluoreszieren beginnt. Adhärenzte Zellen werden einmal mit PBS gewaschen und im Anschluss bei 37°C für 30 min mit einer 1:1000 Verdünnung der DCFDA-Stammlösung (25 nM) inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit werden die Zellen 2mal mit vorgewärmtem sterilen PBS gewaschen. Die Fluoreszenzintensität wurde dann mit einem ELISA-Reader gemessen.



### 3.2.8. Molekularbiologische Methoden

#### **RNA-Isolation mittels *Masterpure™ Complete DNA-RNA-Purification-Kit* (EPICENTRE Biotechnologies)**

Zur Untersuchung des Einflusses einer Behandlung auf die Transkription eines bestimmten Gens kann man das genspezifische mRNA-Level untersuchen. Hierfür wurde zu Beginn die Gesamt-RNA einer Probe mit dem *Masterpure™ Complete DNA-RNA-Purification-Kit* (EPICENTRE Biotechnologies) nach Herstellerangaben isoliert.

Vor der Ernte der Zellen, wurden diese einmal mit PBS gewaschen. Nach diesem Waschschrift wurde 1 ml frisches PBS auf die Zellen pipettiert und diese mit einem Zell-Scraper vom Boden des Zellkulturgefäßes abgeschabt. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 4°C und 5000 rpm wurde das PBS abgesaugt und das so entstandene Zellpellet mit 300 µl der im Kit enthaltenen „Tissue & Cell Lysis Solution“ unter Zuhilfenahme eines Sonifikators aufgeschlossen. Zur Entfernung der in der Probe enthaltenen Proteine wird jeder Probe 1 µl Proteinase K hinzupipettiert, gründlich gemischt und 15 min bei 65°C inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wird die Probe alle 5 min gevortext. Im Anschluss wird die Probe für 5 min auf Eis gestellt, um den Proteinverdau abzustoppen. Zur Fällung der Proteine sowie des Zelldebris werden 150 µl „MPC Protein Precipitation Reagent“ zugegeben und für 10 sec gevortext. Um nun die Nukleinsäuren von den gefällten Proteinen zu trennen, wird für 10 min bei 15.000 g und 4°C zentrifugiert. Der so entstandene Überstand enthält den gesamten Nukleinsäurepool der Probe und wird in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zur Aufreinigung der Nukleinsäuren aus der wässrigen Lösung werden diese durch Zugabe von 500 µl eiskaltem 100%igem Isopropanol gefällt. Zur Unterstützung der Fällung wird die Probe nach Zugabe des Isopropanols 30-40mal invertiert und 10 min bei 15.000 g und 4°C zentrifugiert. Um aus dem so entstandenen Nukleinsäurepellet nun die RNA von der ebenfalls enthaltenen DNA zu trennen, wird ein 30 minütiger *DNase I*-Verdau bei 37°C durchgeführt. Nach dem Verdau der DNA wird die *DNase I* durch eine weitere Proteinfällung mit 200 µl „2x T und C Lysis Solution“ und 200 µl „MPC Protein Precipitation Reagent“ aus der Lösung entfernt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 15.000 g und 4°C zur Entfernung des ausgefällten Enzyms, kann die wässrige Lösung, die jetzt nur noch die RNA enthält, in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt werden und die RNA mittels 500 µl eiskaltem Isopropanol unter 30-40 maligem Invertieren ausgefällt werden. Nach der folgenden Zentrifugation (10 min, 15.000 g, 4°C) wird das RNA-Pellet zweimal mit 75%igem Ethanol gewaschen, ohne dass es sich auflöst. Nach dem Abdampfen des Ethanols wird das Pellet in 20 µl des im Kit enthaltenen *TE-Puffers* gelöst. Jeder Probe wird 1 µl des RNase Inhibitors *RiboGuard™* zugegeben. Die RNA-Konzentration der Proben wurde mit Hilfe eines NanoDrops gemessen. Zur Weiterverarbeitung der RNA wurde aus jeder Probe eine RNA-Arbeitslösung mit einer Konzentration von 500 ng/µl in DEPC-H<sub>2</sub>O hergestellt. Sowohl die Stammlösung als auch die Arbeitslösung können bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert werden.

#### **cDNA-Synthese mittels *RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas)**

Da bei der vorhergegangenen RNA-Isolation jeder RNA-Typ isoliert wurde, wird im Folgenden mithilfe des *RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas) cDNA der mRNA synthetisiert, um mithilfe einer anschließenden PCR die Expressionsveränderung bestimmter Gene anhand des jeweiligen mRNA-Levels untersuchen zu können. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass durch den

Einsatz eines oligo(dT)<sub>18</sub>Primers, der an den Poly(A)-Schwanz der mRNA bindet, nur die reverse Transkription dieses RNA-Typs möglich ist.

Die Durchführung der cDNA-Synthese erfolgt nach Herstellerangaben, wobei für einen Ansatz 1 µg Template RNA eingesetzt wurde. Zu der vorgelegten Template RNA wird 1 µl oligo(dT)<sub>18</sub>Primer hinzupipettiert und das Volumen des Ansatzes mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 12 µl aufgefüllt. Im Folgenden werden 4 µl 5x Reaction Buffer, 1 µl RiboLock™ RNase Inhibitor (20 U/µl), 2 µl 10 mM dNTP-Mix sowie 1 µl der RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) in der hier angegebenen Reihenfolge hinzupipettiert. Der fertige Reaktionsansatz wird nun im Thermocycler für 60 min bei 42°C inkubiert. Zur Determination der Synthese wird der Ansatz final für 5 min auf 70°C erhitzt. Die so erhaltene cDNA der Probe kann sofort weiter verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

### PCR mittels *TopTaq*™-PCR-Kit (Qiagen)

Zur Untersuchung des Expressionslevels eines bestimmten Genes kann mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung eines spezifischen Primerpaares genau das Transkript dieses Genes aus der gesamten cDNA einer Probe amplifiziert werden. Das Primerpaar besteht hierbei aus einem genspezifischen Forward-Primer, welcher der Polymerase am 5'-Ende der cDNA als Startpunkt dient, sowie einem ebenfalls genspezifischen Reverse-Primer, zum Start der Polymerase-Kettenreaktion am 3'-Ende. Die Annealing-Temperatur der Reaktion richtet sich nach den jeweiligen Schmelztemperaturen des verwendeten Primerpaares.

Zur Durchführung der PCR wird im ersten Schritt ein Mastermix aus den folgenden Komponenten zusammenpipettiert:

DEPC-H <sub>2</sub> O	11,8 µl
10x PCR Buffer	3 µl
10x CoralLoad Concentrate	3 µl
5x Q-Solution	6 µl
dNTP-Mix (dATP; dTTP; dCTP; dGTP jeweils 10 mM)	1 µl
Forward-Primer (10 pmol/µl)	1,5 µl
Reverse-Primer (10 pmol/µl)	1,5 µl
Top Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl

Die Tabelle gibt die notwendigen Volumina für eine Reaktion und ein Gesamtreaktionsvolumen von 30 µL an. Für mehrere Reaktionen werden die Volumina entsprechend der Anzahl der Reaktion multipliziert und der Mastermix wird anschließend auf die benötigte Menge Reaktionsgefäße aliquotiert und je Ansatz 2 µl cDNA der zu untersuchenden Proben hinzupipettiert.

Für die Reaktion wird der verwendete Thermocycler wie folgt programmiert:

Initiale Denaturierung:	3 min, 94°C
<u>amplifikatspezifische Zyklen:</u>	
Denaturierung	30 sec, 94°C
Annealing	30 sec, Temperatur primerspezifisch
Extension	1 min, 72°C
Finale Extension:	10 min 72°C

Die Anzahl der Zyklen richtet sich nach dem jeweiligen Genprodukt, das untersucht werden soll. Für die Quantifizierung des genspezifischen Expressionslevels der verschiedenen Proben wird für jede Probe eine Kontrolle mitgeführt. Bei dieser handelt es sich um einen PCR-Ansatz, in dem das Transkript eines sogenannten Haushaltsgens in der zu untersuchenden Probe amplifiziert wird. Diese Haushaltsgene sollten von der jeweiligen Behandlung nicht betroffen sein und somit in allen Proben in gleicher Menge vorliegen. Hier wurden für die PCR-Kontrolle Primer für das Gen der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (*gapdh*) verwendet.

### Agarosegel-Elektrophorese zur Analyse des PCR-Produkts

Zur quantitativen Analyse der amplifizierten PCR-Produkte der verschiedenen Proben werden diese für die Agarosegel-Elektrophorese auf ein 1,2%iges Agarosegel aufgetragen. Die Agarosegele werden mit 1xTAE-Puffer hergestellt und zur Detektion der DNA-Banden 6 µl RotiSafe zugefügt. Da in den PCR-Produkten bereits der Auftragspuffer *CoralLoad* enthalten ist, können diese nach dem Aushärten des Gels direkt in die Taschen pipettiert werden. Um überprüfen zu können, ob das erhaltene PCR-Produkt der erwarteten Größe entspricht, wird bei jedem Auftrag ein DNA-Standard (z.B. 100bpPlus-Leiter (3 µl)) mitgeführt. Die Agarosegel-Elektrophorese wird bei einer Spannung von 75 V durchgeführt. Das Gel wurde im Anschluss mit dem Chemismart 2100 System dokumentiert und anhand der digitalen Aufnahme eine Bildanalyse zur Quantifizierung der Bandenintensität mittels ImageJ 1.48v (Wayne Rband, National Institutes of Health, USA) durchgeführt.

### 3.2.9. Protein- und Molekülanalysen

#### Western Blot

##### *Zellyse*

Für die Lyse der Zellen wurde der fertige *10x Lysepuffer* von Cell Signaling nach Herstellerangaben verdünnt. Zur Inhibition verschiedener Proteinasen, Proteasen sowie Phosphatasen wurde dem Lysepuffer 1 mM PMSF zugegeben. Bevor die Zellen lysiert wurden, wurden sie einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden 0,5 ml des Lysepuffers pro 10 cm-Zellkulturschale auf die Zellen

---

pipettiert und für 2 min auf Eis inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Proteinlysate in 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

#### ***Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradfordreagenz***

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Lysate wurde photometrisch mittels Bradfordanalyse durchgeführt. Hierfür werden pro Ansatz 200 µl Bradford-Reagenz mit 800 µl dH<sub>2</sub>O verdünnt. 1 µl des Proteinlysates wird hinzupipettiert und durch Invertieren gut durchmischt. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit wird die Absorption der Lösung bei 595 nm in einem Photometer gemessen. Zur genauen Bestimmung der Proteinkonzentration der Lösung wird der gemessene Absorptionswert mit einem Faktor multipliziert, der mittels BSA-Eichreihe bestimmt wurde.

#### ***Zellaufschluss***

Für den Proteinaufschluss wurden die Proteinlysate mit VE-Wasser so verdünnt, dass alle zu vergleichenden Proben eine gleiche Proteinkonzentration haben. 36,5 µl dieser Verdünnung werden mit 9 µl 5x-Lämmli-Puffer versetzt und aufgekocht. Sollten Proteine bis zu einer Größe von 150 kDa untersucht werden, wurde der Ansatz bei 95°C für 5 min aufgekocht. Zum Aufschluss größerer Proteine hingegen wurden die Proben für 10 min bei 80°C erhitzt. Nach der Hitzebehandlung wurden die Proben 30 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend können die Proben entweder direkt weiterverwendet oder bei -20°C gelagert werden.

#### ***SDS-Gelelektrophorese***

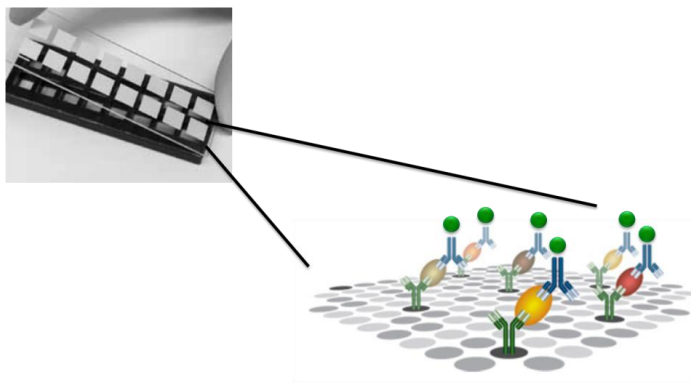
Je 43,5 µl der aufgeschlossenen Proteinextrakte werden in die Taschen einer SDS-Page pipettiert. Bei konstanten 100 V werden die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Für den anschließenden Proteintransfer aus dem Gel auf eine 0,2 nm Nitrocellulosemembran wird für 45 min an einem Tank-Blot-System eine konstante Spannung von 100 V angelegt. Um die gleichmäßige Übertragung der Proteine zu überprüfen, wird die Membran nach dem Blotvorgang für ca. 2 min in einer 0,2%igen Ponceau-Lösung inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wird die Färbelösung durch Waschen mit VE-Wasser entfernt und die Membran in 5%iger Milch/TBST für 1 h geblockt. Der primäre Antikörper wird entweder in 5% Milch/TBST oder 5% BSA/TBST 1:1000 verdünnt und die Membran über Nacht bei 4°C in diesem inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST wird die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit sekundärem HRP-gekoppeltem Antikörper (1:10.000) in 5%iger Milch/TBST inkubiert. Um ungebundene Antikörper von der Membran zu entfernen, wird vor der Proteindetektion zweimal mit TBST gewaschen.

#### ***Proteindetektion***

Zur Detektion der spezifischen Proteinbande auf der Membran wird diese mit einem 1:1 Gemisch der beiden Komponenten der jeweiligen Detektionslösung (LumiLight, WesternBright Sirius/Quantum HRP substrate) für 2 min behandelt. Da der sekundäre Antikörper Peroxidase-gekoppelt ist, kann dort, wo er gebunden wurde, das Substrat umgesetzt werden und die dadurch entstehende Chemilumineszenz mit Hilfe des Chemismart 2100 Systems gemessen werden. Anhand der digitalen Aufnahme wurde eine Bildanalyse zur Quantifizierung der Bandenintensität mittels ImageJ 1.48v (Wayne Rband, National Institutes of Health, USA) durchgeführt.

### PathScan®-Antibody Array Kits von Cell Signaling

Diese Methode beruht auf dem Prinzip des Sandwich-ELISAs. Antikörper, die gegen bestimmte Proteine oder posttranslationale Modifikationen gerichtet sind, werden auf eine Glasplatte geblottet. Die aus einer Probe isolierten Proteine werden auf diese Glasplatte pipettiert und durch die auf der Glasplatte fixierten Antikörper gebunden. Im nächsten Schritt wird ein Kit-spezifischer Antikörper-Cocktail hinzupipettiert. Diese Antikörper binden wiederum an die bereits aufgetragenen Proteine der zu untersuchenden Proben. Mit Hilfe von HRP-gekoppeltem Streptavidin können nun die gebundenen Proteine der Proben über Chemilumineszenz detektiert werden (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Prinzip PathScan® Antibody Arrays.**

Auf einer Glasplatte werden Antikörper aufgebracht, die die Proteine einer zu untersuchenden Probe binden. Im nächsten Schritt wird abermals Antikörper auf die gebundenen Proteine gegeben und mit Hilfe von HRP-gekoppeltem Streptavidin wird das Proteinsignal über Chemilumineszenz detektierbar gemacht. Quelle: *modifiziert nach Data Sheet Cell Signaling PathScan®-Assay #12856*

Die hier verwendeten PathScan®-Assays wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Im Kit enthaltene Komponenten	Vorbereitung
<i>PathScan®-Sandwich ELISA Lysis Buffer</i>	
<i>20x Array Wash Buffer</i>	mit MilliQ auf 1x verdünnen
<i>Array Blocking Buffer</i>	
<i>Array Diluent Buffer</i>	
<i>10x Detection Antibody Cocktail (Kit-spezifisch)</i>	mit Array Diluent Buffer auf 1X verdünnen
<i>10x HRP-Linked Streptavidin</i>	mit Array Diluent Buffer auf 1X verdünnen
<i>20x LumiGLO®-Reagent</i> <i>20x Peroxide</i>	je 0,5 µl beider Substanzen zusammen in 9 ml MilliQ verdünnen

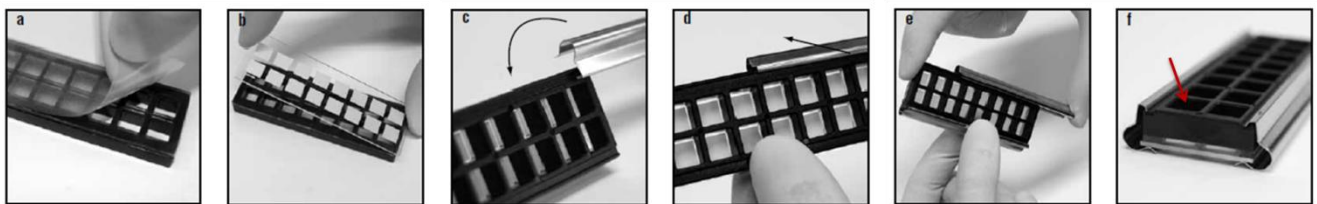
### Zellyse und Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Lyse der Zellen wurde der im Kit enthaltene *1x Lysepuffer* verwendet. Zur Inhibition verschiedener Proteinasen, Proteasen sowie Phosphatasen wurde dem Lysepuffer 1 mM PMSF zugegeben. Vor der Zellyse wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend auf Eis 5 min mit Hilfe des Lysepuffers lysiert. Um etwaigen Zelldebris aus der Proteinlösung zu entfernen,

wurde diese 10 min bei 4°C mit 15.000 g zentrifugiert und in neue Eppis überführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Lysate wurde photometrisch mittels Bradfordanalyse durchgeführt. Mit dem im Kit enthaltenen *Array Diluent Buffer* wurden Arbeitslösungen der Proben mit einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml hergestellt.

### **Assay-Durchführung**

Vor Beginn der Durchführung des Assays wurde dieser, wie in Abbildung 16 dargestellt, zusammengebaut. Auf den weißen Feldern, die man in Abbildung 16 (b) sieht, sind die Antikörper, mit deren Hilfe der Proteinnachweis durchgeführt wird, aufgebracht. Durch das Silikongerüst (Abbildung 16 (a)), werden die Felder gegen einander abgegrenzt. Mit Hilfe der rechts und links angebrachten Metallklammern (Abbildung 16 (c)) werden Silikongerüst und Glasplatte so fest aneinander gedrückt, dass die Kammern, in die die Proben pipettiert werden (Abbildung 16 (f), roter Pfeil), dicht sind.



**Abbildung 16: Zusammenbau eines PathScan® Antibody Array-Riegels.**

Die Glasplatte, auf die die Antikörper gegen die zu untersuchenden Proteine aufgebracht sind, wird mit Hilfe eines Silikongerüsts in einzelne Kammern unterteilt. Glasplatte und Silikongerüst werden über Metallklammern so fest miteinander verbunden, dass die Kammern, in die die Proben pipettiert werden (roter Pfeil (f)), dicht abgeschlossen sind. Quelle: *modifiziert nach Data Sheet Cell Signaling PathScan®-Assay #12856*

Bevor die Proben in die Kammern pipettiert werden, wird der Assay mit 150 µl des *Array Blocking Buffer* 15 min bei RT geblockt. Nach Entfernen des Blockpuffers werden, je nach Assay, 100-150 µl Probe in jede Kammer pipettiert und für 2 h bei RT auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Anschließend wird der Assay 4mal 5 min mit 200 µl des *1x Array Wash Buffers* gewaschen. Nach den Waschschritten werden 150 µl *1x Detection Antibody Cocktail* pro Kammer einpipettiert und der Assay für 1 h bei RT auf dem Orbitalschüttler geschüttelt. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wird nach dieser Inkubationszeit abermals 4mal 5 min mit 200 µl des *1x Array Wash Buffers* gewaschen. Im nächsten Schritt wird 150 µl *1x HRP-gekoppeltes Streptavidin* in die Kammern pipettiert. Nach 30 min werden ein weiteres Mal vier fünfminütige Waschschriffe mit *1x Array Wash Buffers* durchgeführt. Die Detektion der gebundenen Proteine wird mittels *LumiGLO®-Reagent/Peroxide* im Chemismart 2100 System durchgeführt. Anhand der digitalen Aufnahme wurde eine Bildanalyse zur Quantifizierung der Assays mittels ImageJ 1.48v (Wayne Rband, National Institutes of Health, USA) durchgeführt.



## Calcium Colorimetric Assay Kit von BioVision

Das Calciumlevel einer Probe wird in diesem Kit darüber bestimmt, dass die in der Probe enthaltene Calciumionen einen Komplex mit dem im Kit enthaltenen o-Cresolphthalein (*Chromogenic Reagent*) eingehen. Durch diese Komplexbildung kommt es zu einem colorimetrisch messbaren Farbumschwung. Zur genauen Bestimmung des Calciumspiegels der Proben wird eine Standardkurve mitgeführt. Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Im Kit enthaltene Komponenten	Vorbereitung
<i>Calcium Assay Buffer</i>	
<i>Chromogenic Reagent</i>	
<i>Calcium Standard</i> (500 mM)	6 Konzentrationen für Standardkurve herstellen

### **Probenaufbereitung und Bestimmung der Proteinkonzentration**

Da die Messung des Calciumspiegels im Zytosol der Zellen durchgeführt werden sollte, wurde vor Beginn dieses Assays mit Hilfe des *Mitochondria/Cytosol Fractionation Kits* von BioVision nach Herstellerangaben eine Fraktionierung der Zellbestandteile vorgenommen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zytosolfraction wurde photometrisch mittels Bradfordanalyse durchgeführt. Bei diesem Assay diente die Bestimmung der Proteinkonzentration lediglich zur Überprüfung, dass die Konzentration der Proben untereinander nicht zu stark voneinander abweichen, da von jeder Probe eine gleiche Menge des Lysats für den Assay eingesetzt wird.

### **Assay-Durchführung**

Vor Beginn der Assay-Durchführung wird aus dem im Kit enthaltenen *Calcium Standard* eine Verdünnungsreihe als Eichreihe hergestellt. Die Stammlösung (500 mM) wird zuerst 1:100 in MilliQ verdünnt. Aus dieser Verdünnung (5 mM) werden jeweils 0, 2, 4, 6, 8 und 10  $\mu\text{l}$  in eine Kavität einer 96 Loch-Kulturplatte vorgelegt, das Volumen wird mit MilliQ auf 50  $\mu\text{l}$  pro Kavität aufgefüllt. Daraus ergeben sich folgende Calciumkonzentrationen: 2  $\mu\text{g}$ , 1,6  $\mu\text{g}$ , 1,2  $\mu\text{g}$ , 0,8  $\mu\text{g}$ , 0,4  $\mu\text{g}$  und 0  $\mu\text{g}$

Nach Herstellung dieser Eichreihe werden je 50  $\mu\text{l}$  der zu untersuchenden Probe pro Kavität in die 96 Loch-Kulturplatte vorgelegt. Für jede Probe wird eine Zweifachbestimmung vorgenommen. In jede Kavität werden im nächsten Schritt 90  $\mu\text{l}$  der *Chromogenic Reagent* sowie 60  $\mu\text{l}$  des *Calcium Assay Buffers* hinzupipettiert. Nach 5-10 min Inkubation unter Lichtausschluss wird die oben beschriebene Farbreaktion in einem Mikropplattenleser bei 575 nm gemessen. Für die Auswertung wurden alle Messwerte auf die jeweilige Kontrolle normiert und der Calciumgehalt der Proben in Prozent angegeben.

### ***Cyclic AMP XP<sup>®</sup> Assay von Cell Signaling***

Bei diesem Assay handelt es sich um einen kompetitiven enzym-gekoppelten Immunoassay, mit dessen Hilfe das cAMP-Level in Proben bestimmt werden kann. Für die Bestimmung des cAMP-Levels werden Zellen lysiert und eine 1:1 Mischung aus Probe sowie im Kit enthaltenem HRP-gekoppeltem cAMP in eine 96 Loch-Assay-Platte pipettiert, deren Boden mit einem monoclonalen Antikörper gegen cAMP beschichtet ist. Das cAMP des eingesetzten Zelllysates konkurriert mit dem HRP-gekoppelten cAMP des Kits um die Bindungsstellen an den Antikörpern. Je mehr cAMP also in der Probe enthalten ist, umso mehr wird auch gebunden und umso weniger HRP-gekoppeltes cAMP kann gebunden werden. Daraus ergibt sich, dass in Kavitäten, in denen besonders viel cAMP in der Probe enthalten ist, eine geringe Chemilumineszenz detektiert wird, da wenig des HRP-gekoppelten cAMP gebunden werden konnte. Um sicher gehen zu können, dass der Test korrekt durchgeführt wurde, wurde eine Standardkurve mitgeführt. Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Im Kit enthaltene Komponenten	Vorbereitung
<i>10x Cell Lysis Buffer</i>	mit MilliQ auf 1x verdünnen
<i>cAMP-HRP Conjugate</i>	1:1 Verdünnung mit der Probe
<i>cAMP Standard (2,4 <math>\mu</math>M)</i>	8 Konzentrationen für Standardkurve herstellen
<i>20x Wash Buffer</i>	mit MilliQ auf 1x verdünnen
<i>Luminol/Enhancer Solution</i> <i>Stable Peroxide Buffer</i>	1:1 Verdünnung mit der beiden Komponenten zur Herstellung der Detektionslösung

### ***Zelllyse und Bestimmung der Proteinkonzentration***

Für diesen Assay werden Zellen in eine 96 Loch-Kulturplatte gesät und im Anschluss in dieser behandelt. Dem im Kit enthaltene *Cell Lysis Buffer* wird zur Inhibition verschiedener Proteinasen, Proteasen sowie Phosphatasen 1 mM PMSF zugegeben. Vor der Zelllyse wurden die Zellen 2mal mit 200  $\mu$ l eiskaltem PBS pro Kavität gewaschen und anschließend auf Eis 5 min mit Hilfe des *Cell Lysis Buffers* lysiert. Das Zelllysate wird vorsichtig in Eppis überführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Lysate wurde photometrisch mittels Bradfordanalyse durchgeführt. Bei diesem Assay diente die Bestimmung der Proteinkonzentration lediglich zur Überprüfung, dass die Konzentration der Proben untereinander nicht zu stark voneinander abweichen, da von jeder Probe eine gleiche Menge des Lysats für den Assay eingesetzt wird.

### ***Assay-Durchführung***

Vor Beginn der Assay-Durchführung wird aus dem im Kit enthaltenen cAMP-Standard eine Verdünnungsreihe als Eichreihe hergestellt. Die Stammlösung (2,4  $\mu$ M) wird zuerst 1:10 in *Cell Lysis Buffer* verdünnt, daraus ergibt sich als höchste Konzentration der Eichreihe 240 nM. Im Folgenden wird ebenfalls in *Cell Lysis Buffer* eine serielle 1:3 Verdünnungsreihe erstellt: 240 nM, 80 nM, 26,7 nM, 8,9 nM, 3 nM, 1 nM, 0,3 nM und 0 nM

Die Verdünnungen der Eichreihe werden je in eine Kavität der im Kit enthaltenen 96-Loch-Assay-Platte pipettiert. Zur Bestimmung des cAMP-Gehalts der zu untersuchenden Proben werden jeweils 25  $\mu$ l des



Zelllysates und 25  $\mu$ l *cAMP-HRP Conjugate* in eine Kavität der 96-Loch-Assay-Platte pipettiert. Die Inkubationszeit des Assays beträgt 3 h bei RT. Die Inkubation wird auf einem Orbitalschüttler durchgeführt. Im Anschluss wird jede Kavität 4mal mit 200  $\mu$ l des *Wash Buffers* gewaschen. Nach dem Waschen werden in jeder Kavität 50  $\mu$ l der Detektionslösung zugegeben und der cAMP-Gehalt der Proben in einem Luminometer bei 425 nm gemessen. Für die Auswertung wurden die gemessenen Werte der Proben auf die jeweilige unbestrahlte Kontrolle normiert. Da es sich um einen kompetitiven Assay handelt, wurden für den cAMP-Gehalt dann die reziproken Werte angegeben. Werte größer als 1 bedeuten eine Zunahme des zellulären cAMPs im Lysat, Werte kleiner 1 eine Abnahme.

### ***Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit von BioVision***

In diesem Assay wird die Aktivität der SOD darüber gemessen, dass dem zu untersuchenden Zelllysate WST-1 (Water soluble tetrazolium) zu gegeben wird, das wiederum durch das Enzym zu WST-1 Formazan umgesetzt wird. Dieser Farbstoff kann dann colorimetrisch gemessen werden. Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

<b>Im Kit enthaltene Komponenten</b>	<b>Vorbereitung</b>
<i>WST Solution</i>	<i>WST Working Solution:</i> 1:20 mit <i>SOD Assay Buffer</i> verdünnen
<i>SOD Enzyme Solution</i>	<i>Enzyme Working Solution:</i> 5 sec zentrifugieren dann durch auf- und abpipettieren gut mischen 15 $\mu$ l <i>SOD Enzyme Solution</i> mit 2,5 ml <i>SOD Diluent Buffer</i> verdünnen
<i>SOD Assay Buffer</i>	
<i>SOD Diluent Buffer</i>	

### ***Zellyse und Bestimmung der Proteinkonzentration***

Im ersten Schritt werden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Die anschließende Zellyse wird in eiskaltem 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4 mit 0,5% Triton X-100, 5 mM  $\beta$ -ME und 0,1 mg/ml PMSF durchgeführt. Das Zelllysate wird 5 min bei 15.000 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand, der die SOD sowohl aus dem Cytoplasma als auch aus den Mitochondrien enthält, wird in ein neues Eppli überführt und bis zur Messung auf Eis gehalten. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Lysate wurde photometrisch mittels Bradfordanalyse durchgeführt. Bei diesem Assay diente die Bestimmung der Proteinkonzentration lediglich zur Überprüfung, dass die Konzentration der Proben untereinander nicht zu stark voneinander abweichen, da von jeder Probe eine gleiche Menge des Lysats für den Assay eingesetzt wird.

### Assay-Durchführung

Das Pipettierschema des Assays ist Abbildung 17 zu entnehmen. Durchgeführt wird der Assay in einer 96 Loch-Kulturplatte. Für jede zu einzelne Probe muss ein sogenannter „Blank 2“ hergestellt werden. Dieser Blank besteht aus 20 µl der zu messenden Probe, 200 µl *WST Working Solution* und 20 µl *Dilution Buffer*, es wird jedoch keine *Enzyme Working Solution* hinzupipettiert. Die anderen beiden Blanks können für eine Messreihe gemeinsam genutzt werden. Für jede Probe wurde eine Zweifachbestimmung vorgenommen. Zu Beginn werden in jede Proben- sowie „Blank 2“-Kavität 20 µl der jeweiligen Probe vorgelegt. In „Blank 1“ und „Blank 3“ wird die Probe durch MilliQ ersetzt. Anschließend werden 200 µl *WST Working Solution* in jede Kavität pipettiert. In die Proben-Kavitäten sowie in „Blank 1“ werden nun 20 µl *Enzyme Working Solution* zugegeben. In alle „Blank 2“-Kavitäten sowie in „Blank 3“ werden stattdessen 20 µl *Diluent Buffer* hinzupipettiert.

	sample	blank 1	blank 2	blank 3
Sample Solution	20 µl		20 µl	
ddH <sub>2</sub> O		20 µl		20 µl
WST Working Solution	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Enzyme Working Solution	20 µl	20 µl		
Dilution Buffer			20 µl	20 µl

Abbildung 17: Pipettierschema *Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit*.

Die 96 Loch-Kulturplatte wird vor der Messung 20 min bei 37°C inkubiert. Die Messung der SOD Aktivität wird im Anschluss in einem Mikroplattenleser bei 450 nm durchgeführt. Die Berechnung der *Superoxid Dismutase*-Aktivität wird über die folgende Formel durchgeführt:

$$\text{SOD Activity (Inhibition rate \%)} = \frac{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})} \times 100$$

Für den Vergleich der Proben untereinander wurden sie im Anschluss alle auf ihre jeweilige Kontrolle normiert.

### 3.2.10. Auswertung der verschiedenen Endpunkte im humanen Vollhautmodell

#### Detektion von Doppelstrangbrüchen mittels immunhistochemischem Nachweis von 53BP1-Foci

Für die Analyse von Doppelstrangbrüchen in den humanen Vollhautmodellen wurde in diesen das Protein 53BP1 immunhistochemisch nachgewiesen (s. „Antikörperfärbung auf Schnitten der Vollhautmodelle“). Anschließend wurden Ausschnitte des *Stratum Basale* sowie der Dermis der gefärbten Schnitte konfokalmikroskopisch mit einem Leica TCS SP5 II Scanningmikroskop mit 100facher Vergrößerung aufgenommen. Die Bildanalyse sowie Bildbearbeitung wurde mit ImageJ 1.48v (Wayne Rband, National Institutes of Health, USA) durchgeführt. Hierfür wurde die Anzahl der 53BP1-Foci jeweils in 50 Zellen des *Stratum Basale* sowie in 50 Zellen der Dermis ausgezählt und gemittelt.

---

### **Bestimmung des apoptotischen Index in der Dermis der humanen Vollhautmodelle**

Für die Bestimmung des apoptotischen Index in der Dermis der humanen Vollhautmodelle wurden apoptotische Zellen mittel TUNEL detektierbar gemacht (s. „Detektion apoptotischer Zellen in humanen Vollhautmodellen mittels TUNEL Methode“). Die Auswertung der TUNEL-Färbung wurde an einem Axio Observer.D1 mit 20facher Vergrößerung durchgeführt. Ausgewertet wurden 1000 Fibroblasten pro Schnitt, aus denen dann der prozentuale Anteil TUNEL-positiver Zellkerne bestimmt wurde.

### **BrdU-Proliferationsstudien im *Stratum Basale* der humanen Vollhautmodelle**

Für die Proliferationsstudien wurden Vollhautmodelle über 24 h mit 25  $\mu$ M BrdU inkubiert und anschließend fixiert. Der Einbau des Basenanalogs wurde immunhistochemisch nachgewiesen (s. „Antikörperfärbung auf Schnitten der Vollhautmodelle“). Anschließend wurden Ausschnitte des *Stratum Basale* der gefärbten Schnitte konfokalmikroskopisch mit dem Leica TCS SP5 II Scanningmikroskop mit 63facher Vergrößerung aufgenommen. Die Bildanalyse wurde mit ImageJ 1.48v (Wayne Rband, National Institutes of Health, USA) durchgeführt. Ausgewertet wurden jeweils 250 Zellen pro Probe, aus denen dann der prozentuale Anteil BrdU-positiver Zellkerne bestimmt wurde.

### **Auswertung Ki-67 positiver Zellen im *Stratum Basale* der humanen Vollhautmodelle**

Für die Analyse des Proliferationsmarkers Ki-67 in den Keratinozyten des *Stratum Basale* der humanen Vollhautmodellen wurde dieser immunhistochemisch nachgewiesen (s. „Antikörperfärbung auf Schnitten der Vollhautmodelle“). Anschließend wurden Ausschnitte des *Stratum Basale* der gefärbten Schnitte konfokalmikroskopisch mit einem Leica TCS SP5 II Scanningmikroskop mit 63facher Vergrößerung aufgenommen. Die Bildanalyse sowie Bildbearbeitung wurde mit ImageJ 1.48v (Wayne Rband, National Institutes of Health, USA) durchgeführt. Ausgewertet wurden jeweils 250 Zellen pro Probe, aus denen dann der prozentuale Anteil Ki-67 positiver Zellkerne bestimmt wurde.

## **3.2.11. Auswertung der verschiedenen Endpunkte der Monolayerzellkultur**

### **Bestimmung BrdU-Aufnahmerate sowie H3K9me3-Level mittels MetaCyte Software**

Proben wurden jeweils einem immunhistochemischen Nachweis des Basenanalogs bzw. der Histonmodifikation sowie einer DAPI-Kernfärbung unterzogen (s. „Antikörperfärbung adhärenter Monolayerkulturen“). Mit Hilfe eines Axio Observer A1 Mikroskops und einer CCD Kamera (Zeiss, Deutschland) wurden mindestens 1000 Zellkerne einzeln dokumentiert. Mit Hilfe der MetaCyte Software wurde dann jeweils die mittlere BrdU-, bzw. H3K9m3-Intensität ermittelt. Für die statistische Auswertung wurden die Werte aller gemessenen Zellkerne gemittelt und dieser Mittelwert auf den der jeweiligen Kontrolle normiert.

---

## Auswertungen der Agarosegelelektrophese sowie der Western Blot Analysen

Die bildanalytische Auswertung der Bandenintensität der Agarosegelelektrophese sowie des Western Blots wurden mit den programmeigenen Einstellungen zur Analyse von Banden in ImageJ 1.48v (Wayne Raband, National Institutes of Health, USA) durchgeführt. Die ermittelten Intensitäten wurden auf die des jeweils mitgeführten Haushaltsgens/-proteins normiert.

### Auswertung der PathScan®-Antibody Array Kits von Cell Signaling

Mit Hilfe des *Protein Array Analyzer*-Tools von ImageJ 1.48v (Wayne Raband, National Institutes of Health, USA) wurde bildanalytisch der mittlere Grauwert der detektierten Chemilumineszenz der untersuchten Proteine ermittelt. Da jedes Protein im Duplikat detektiert wurde, wurde aus diesen beiden Grauwerten jeweils ein Mittelwert gebildet. Zur Auswertung des PathScan® *Stress and Apoptosis Signaling Antibody Arrays* wurden die Grauwerte der einzelnen Proteine jeweils auf den des auf dem Riegel enthaltene Haushaltspoteins  $\alpha$ Tubulin normiert. Zur tabellarischen Darstellung der Ergebnisse wurde bestimmt, welche Proben untereinander verglichen werden sollen und diese dann aufeinander bezogen. Dargestellt sind Unterschiede, die größer als 10% sind. Mit einem nach unten gerichteten Pfeil wird angezeigt, dass es sich um einen negativen Effekt handelt, der nach oben gerichtete Pfeil zeigt entsprechend an, dass der Effekt positiv ist.

### Statistik und Darstellung von Diagrammen

Die Auswertung aller Rohdaten wurde mit Microsoft Office Excel 2007 durchgeführt. Die statistische Auswertung, die Darstellung sowie die Signifikanzüberprüfung aller Ergebnisse erfolgten mittels GraphPad Prism 6 statistical software. Mit allen hier gezeigten Ergebnissen wurde ein *two-tailed students t-test* mit folgenden Parametern durchgeführt: CI=95%, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$

---

## 4. Ergebnisse – Hautmodelle

---

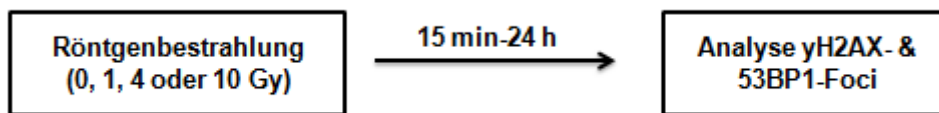
### 4.1. Etablierung eines humanen Vollhautmodells für strahlenbiologische Fragestellungen

Eines der Ziele dieser Arbeit war es zu klären, ob die Schadensantwort von Zellen, die durch ionisierende Strahlung hervorgerufen wird, auch im Gewebe durch eine Vorbestrahlung mit wassergefiltertem Infrarot A beeinflusst wird. Um die Wirkung dieser kombinierten Bestrahlung untersuchen zu können, musste vorab geklärt werden, ob die hier verwendeten humanen Vollhautmodelle (FTSM) für diese Untersuchungen überhaupt geeignet sind.

Zellen, deren DNA durch ionisierende Strahlung geschädigt wurde, aktivieren stressspezifische Signalkaskaden, die ihr Schicksal im Folgenden beeinflussen [196]. Kommt es durch die Bestrahlung zu einem DNA-Doppelstrangbruch (DSB), wird dieser durch sogenannte Mediatorproteine markiert und im Anschluss durch spezielle Reparaturproteine repariert [197]. Diese Proteinkaskaden sollten auch in den humanen Spenderzellen, welche in die hier verwendeten humanen Vollhautmodelle integriert wurden, aktiviert werden. Dies ist eine wichtige Voraussetzung, damit sich diese Gewebekultur für die Untersuchung des Infraroteinflusses auf diese röntgeninduzierten zellulären Mechanismen eignet.

Zur Klärung dieser Fragen wurde zu Beginn untersucht, ob DSBs in den Modellen mit Hilfe immunhistochemischer Methoden markiert werden können. Als Marker für solche DNA-Schäden wurden  $\gamma$ H2AX und 53BP1 gewählt. Bei  $\gamma$ H2AX handelt es sich um die phosphorylierte Form des Histons H2AX, welches nach der Entstehung eines Doppelstrangbruchs ca. 2 Mbp um den Schaden als Signal für andere Proteine der DNA-Schadensantwort an Serin 139 phosphoryliert wird [74, 75]. Das Mediatorprotein 53BP1 wiederum akkumuliert in Folge eines DSBs an der Schadensstelle [198]. Dadurch, dass es nach der Entstehung eines Doppelstrangbruchs somit zu einem erhöhten Vorkommen der beiden Proteine an der geschädigten Stelle der DNA kommt, können die beiden Schadensmarker immunhistochemisch als sogenannte Foci detektiert werden, wobei ein Focus einem DSB entspricht. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob DNA-Doppelstrangbrüche auch in den FTSM dosisabhängig induziert werden und ob nach der Induktion der Brüche ebenfalls eine Reparatur der Schäden stattfindet. Um das endogene Level an DSBs zu bestimmen, wurde bei jedem Versuch ein FTSM mitgeführt, welches unbestrahlt blieb. Quantifiziert wurden 53BP1-Foci in der Gesamtpopulation der Fibroblasten und in den Keratinozyten der Basalschicht der Epidermis.

## Versuchsaufbau:



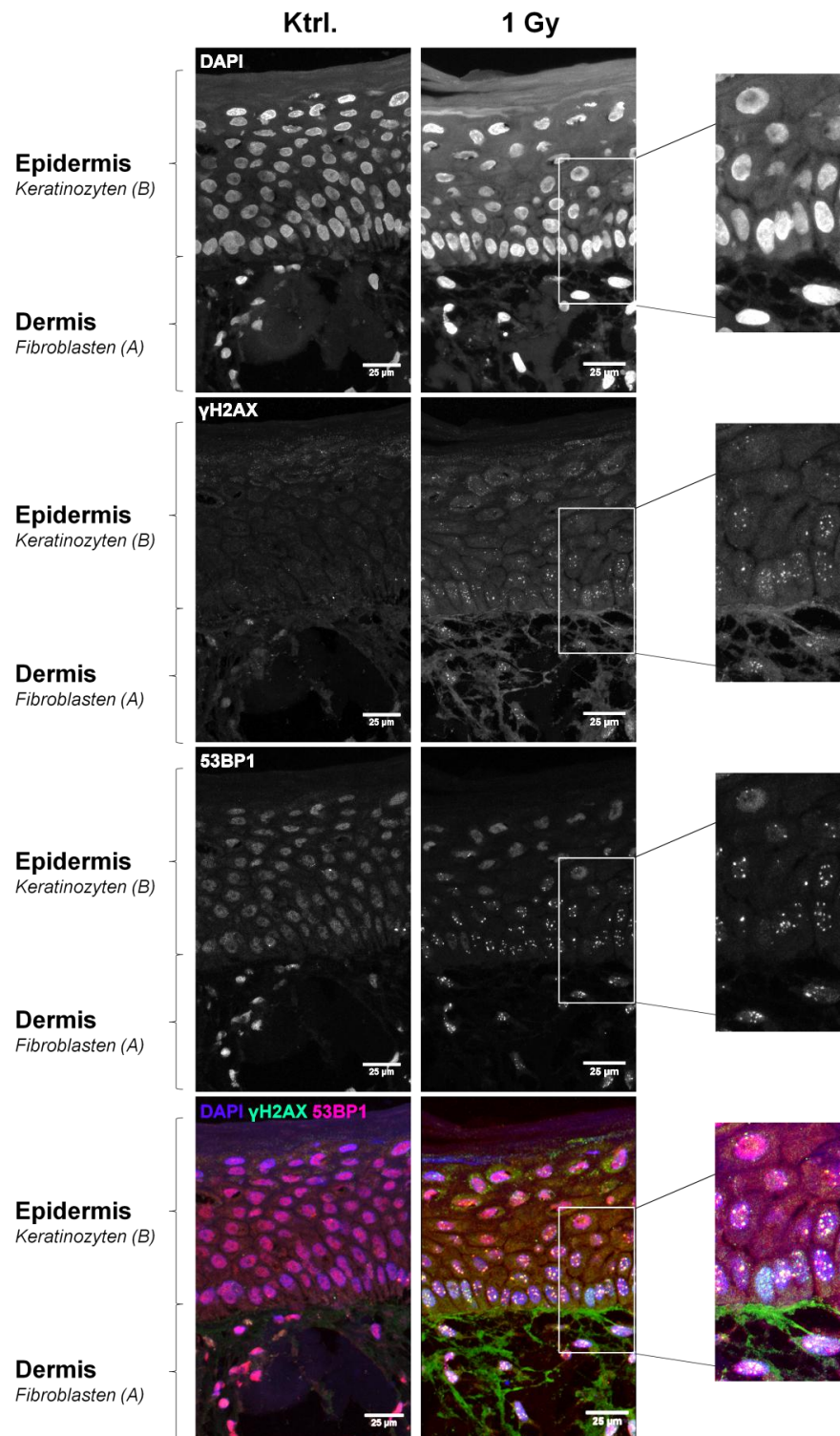
### 4.1.1. DSB-Reparatur in humanen Hautmodellen

Zur Untersuchung der Strahlenantwort von Fibroblasten und Keratinozyten im humanen Hautmodell wurden diese mit 1 Gy bestrahlt und die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) 15 min nach der Bestrahlung über  $\gamma$ H2AX - sowie 53BP1-Foci detektiert (Abbildung 18).

Mittels immunhistochemischer Nachweismethoden ließen sich hierbei sowohl die Phosphorylierung von H2AX als auch die Akkumulation von 53BP1 deutlich nachweisen (Abbildung 18). In den Kontrollzellen lässt sich ein sehr geringes Level an endogenen DSBs mit beiden Markern nachweisen. Für 53BP1 wurde in allen Zellkernen ein pan-nukleäres Signal detektiert. Nach der Bestrahlung mit 1 Gy kam es zu einer deutlich erhöhten Anzahl colokalisierender 53BP1- und  $\gamma$ H2AX-Foci in allen Zellkernen. Interessanterweise ließ sich diese Colokalisation der beiden Schadensmarker in allen Fibroblasten nachweisen, in den Zellen der Epidermis zeigte sich jedoch nur in den Zellen des *Stratum Basale* und des *Stratum Spinosum* eine Akkumulation von 53BP1, die auch hier mit der  $\gamma$ H2AX-Markierung colokalisiert. In den oberen Schichten der Epidermis findet man nur noch  $\gamma$ H2AX-markierte Doppelstrangbrüche, 53BP1 akkumuliert in diesen sich differenzierenden und dadurch teilungsunfähigen Zellen nicht mehr an der DNA-Schadensstelle.

Da die 53BP1-Foci das bessere Signal liefern, wurde im Folgenden die Akkumulation dieses Proteins als Marker für DSBs in den Zellen im humanen Vollhautmodell gewählt. Auch sollten DNA-Doppelstrangbrüche nur in den noch teilungsfähigen Zellen der Haut quantifiziert werden, was durch den 53BP1-Gradienten zusätzlich abgesichert ist.

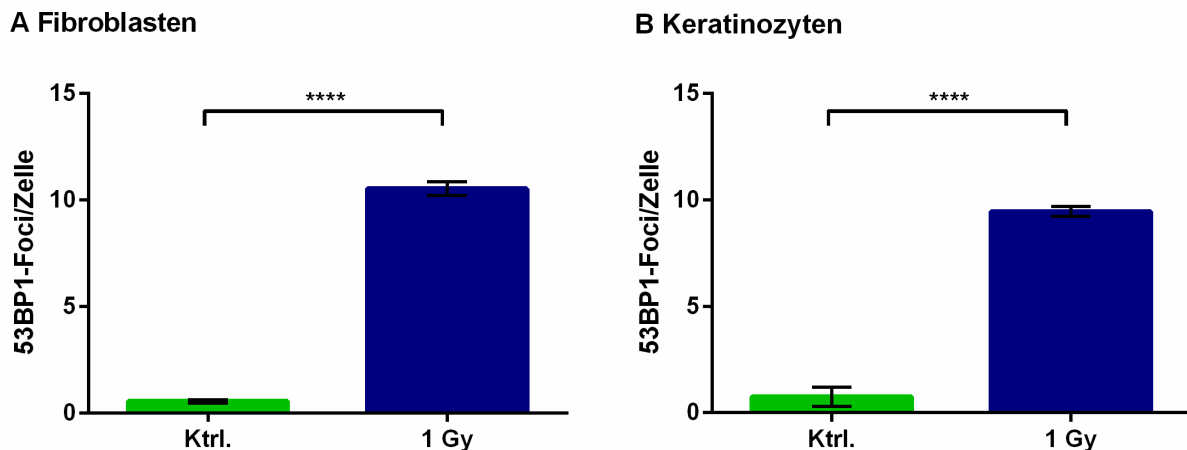




**Abbildung 18:** In den humanen Hautmodellen lassen sich mittels immunhistochemischer Färbung 15 min nach ionisierender Strahlung colokalisierend  $\gamma$ H2AX- und 53BP1-markierte DNA-Doppelstrangbrüche nachweisen.

Die Zellen des Kontrollmodells weisen ein sehr geringes Level an endogenen  $\gamma$ H2AX- und 53BP1-Foci auf. Sowohl die unbestrahlten Fibroblasten (Ktrl., A) als auch die unbestrahlten Keratinozyten (Ktrl., B) aller Schichten weisen ein flächiges 53BP1-Signal über den gesamten Nukleus auf. In den mit 1 Gy bestrahlten Zellen hingegen zeigen sich deutliche  $\gamma$ H2AX-Foci in den Fibroblasten (1 Gy, A), diese colokalisieren überwiegend mit der Akkumulation von 53BP1 am DSB. In der Epidermis (1 Gy, B) akkumuliert 53BP1 nur an den röntgeninduzierten Doppelstrangbrüchen im *Stratum Basale* und im *Stratum Spinosum*. Das Histon H2AX wird nach Bestrahlung hingegen in allen Schichten phosphoryliert.

Bei der Quantifizierung der 53BP1-markierten DSBs im humanen Hautmodell zeigte sich, dass die Rate spontan auftretender endogener Doppelstrangbrüche in beiden Zelltypen sehr gering ist. Im Durchschnitt weisen die Zellen nur etwa einen Focus pro Zelle auf (Abbildung 19, A, B, grüner Balken). In den mit 1 Gy bestrahlten Hautmodellen kam es sowohl bei den Fibroblasten (Abbildung 19, A, blauer Balken) als auch bei den Keratinozyten (Abbildung 19, B, blauer Balken) 15 min nach der Bestrahlung zu einer Induktion von durchschnittlich zehn Foci pro Zelle.



**Abbildung 19: Zellen im humanen Vollhautmodell weisen 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy Röntgen einen signifikanten Anstieg an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) auf.**

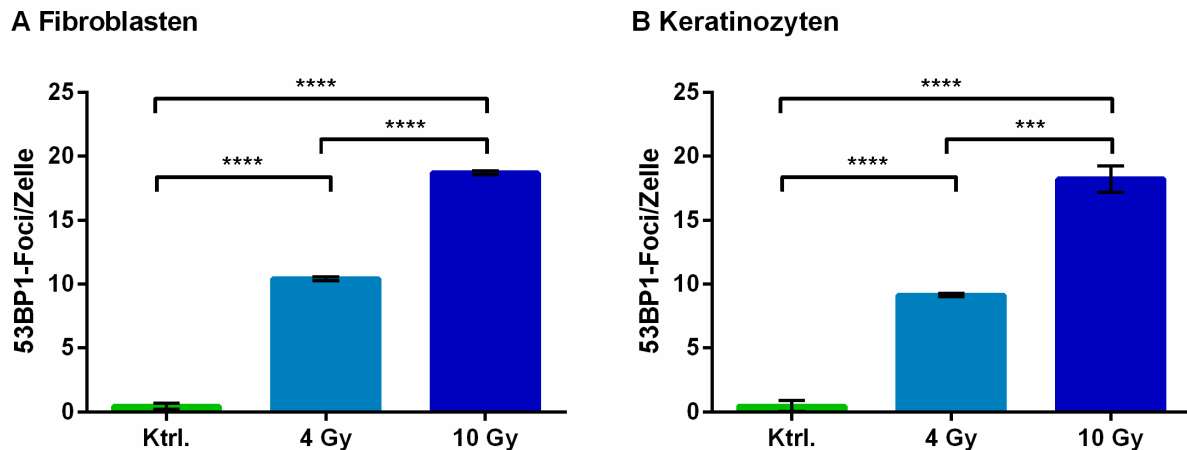
Sowohl die integrierten Fibroblasten (A) als auch die Keratinozyten (B) weisen in den nicht bestrahlten Kontrollmodellen (grüner Balken) im Durchschnitt weniger als einen 53BP1-Focus pro Zelle auf. In den mit 1 Gy bestrahlten Modellen kommt es in beiden Zelltypen zu einer hoch signifikanten Induktion von 53BP1-Foci (blauer Balken). Die Anzahl induzierter DSBs liegt sowohl in den Zellen der Dermis (A) als auch in denen, der basalen Epidermis (B) bei etwa zehn Foci pro Zellkern. Die Werte repräsentieren den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen (n=3, +/- Standardfehler, unpaired two-tailed students t-test CI=95%, \*\*\*\* P<0,0001).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Markierung röntgeninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche durch die Akkumulation von 53BP1 am Bruch direkt nach der Bestrahlung detektierbar ist (Abbildung 18) und es nach einer Bestrahlung mit 1 Gy zu einer signifikanten Induktion von 10 Foci/Gy kommt (Abbildung 19), wurde untersucht, ob die Anzahl von DSBs dosisabhängig steigt. Dies ist ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der zellulären Strahlenantwort. Hierfür wurden FTSM mit 4 Gy und 10 Gy bestrahlt und das 53BP1-Foci Level 4 h nach der Bestrahlung bestimmt.

Die mitgeführten Kontrollmodelle weisen die normale Spontanrate von durchschnittlich einem Focus pro Zelle auf (Abbildung 20, A, B, grüner Balken). Sowohl 4 Gy als auch 10 Gy führen in beiden Zelltypen zu einem signifikanten Anstieg an 53BP1-Foci (Abbildung 20, A, B, blauer Balken). Es zeigt sich auch, dass die Anzahl der DSBs tatsächlich dosisabhängig ist. Während die mit 4 Gy bestrahlten Fibroblasten 4 h nach der Bestrahlung noch etwa zehn (Abbildung 20, A, hellblauer Balken) und die



Keratinocyten (Abbildung 20, B, hellblauer Balken) durchschnittlich neun unreparierte DSBs pro Zelle aufweisen, sind es in beiden mit 10 Gy bestrahlten Zelltypen immer noch etwa 18 (Abbildung 20, A, B, dunkelblauer Balken).

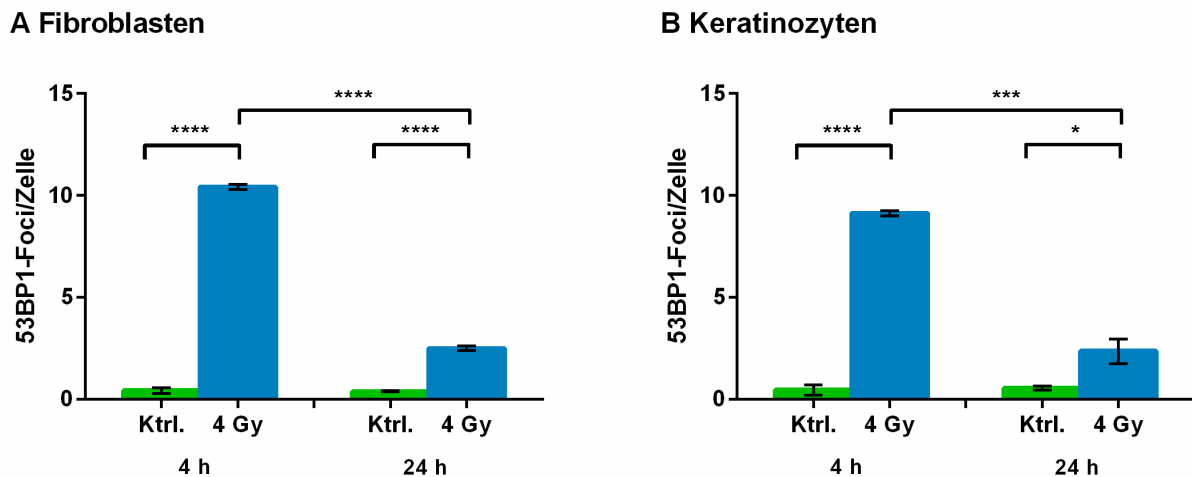


**Abbildung 20:** Nach der Bestrahlung mit unterschiedlichen Röntgendosen zeigt sich, dass auch im Hautmodell die Anzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen dosisabhängig ist.

Sowohl die Fibroblasten (A) als auch die Keratinocyten (B) zeigen 4 h nach der Bestrahlung mit unterschiedlichen Röntgendosen ein dosisabhängiges Level an DSBs. Die Keratinocyten in den mit 4 Gy bestrahlten Modellen (B, hellblauer Balken) weisen zu diesem Zeitpunkt noch etwa neun 53BP1-Foci pro Zelle auf, während die Fibroblasten (A, hellblauer Balken) in den selben Modellen etwa zehn 53BP1-Foci pro Zellen haben. Für beide Zelltypen zeigt sich nach einer Bestrahlung mit 10 Gy (A, B, dunkelblauer Balken) verglichen mit den 4 Gy bestrahlten Zellen noch einmal eine signifikant höhere Anzahl 53BP1-Foci. Die Werte repräsentieren den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen (n=3, +/- Standardfehler, unpaired two-tailed students t-test CI=95%, \*\*\*P<0,001, \*\*\*\*P<0,0001).

Zur endgültigen Beurteilung der zellulären Strahlenantwort der FTSM musste nach der Induktion und der Dosisabhängigkeit auch die Reparaturkapazität der Zellen untersucht werden. 53BP1 spielt bei der DSB-Reparatur nur eine Rolle als Signalprotein zur Markierung der Schäden und zur Rekrutierung von Reparaturproteinen an den Bruch [198]. Somit kann durch die Detektion von 53BP1-Foci im Zellkern zwar davon ausgegangen werden, dass der DNA-Doppelstrangbruch markiert wurde. Um jedoch die tatsächliche Reparaturfähigkeit der Zellen zu untersuchen, muss das 53BP1-Foci Level zu einem späteren Zeitpunkt, zu dem die meisten Brüche schon repariert sein sollten und 53BP1 deshalb an diesen Stellen nicht mehr als Focus nachweisbar wäre, analysiert werden. Hierfür wurden FTSM mit 4 Gy bestrahlt und 24 h nach der Bestrahlung fixiert. Vergleicht man die Anzahl der 53BP1-Foci der röntgenbestrahlten Fibroblasten (Abbildung 21, A, blauer Balken 4 h), die 4 h nach der Bestrahlung fixiert wurden, mit denen, die 24 h nach der Bestrahlung fixiert wurden (Abbildung 21, A, blauer Balken 24 h), zeigt sich, dass diese im Mittel auf 2,5 Foci pro Zelle gesunken ist. Denselben Effekt findet man auch beim Vergleich der unbestrahlten und der bestrahlten Keratinocyten vor. Vier Stunden

nach der Bestrahlung weisen Keratinozyten im FTSM durchschnittlich neun DSBs pro Zelle auf (Abbildung 21, B, blauer Balken 4 h), 20 h später verbleiben nur noch ungefähr zwei 53BP1-Foci pro Zelle (Abbildung 21, B, blauer Balken 24 h).



**Abbildung 21: Die humanen Hautmodelle weisen eine gewebetypische Reparaturkinetik auf.**

24 h nach der Bestrahlung mit 4 Gy weisen beide Zelltypen (A, Fibroblasten; B, Keratinozyten) im Vergleich zu den Zellen in den unbestrahlten Kontrollen zwar nach wie vor eine signifikant höhere Anzahl an 53BP1-Foci auf. Vergleicht man das 53BP1-Foci Level dieser Zellen jedoch mit dem der 4 h nach der Bestrahlung fixierten Modellen, zeigt sich, dass beide Zelltypen signifikant weniger 53BP1-Foci aufweisen. Die Werte repräsentieren den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen (n=3, +/- Standardfehler, unpaired two-tailed students t-test CI=95%, \* P<0,05, \*\*\* P<0,001, \*\*\*\* P<0,0001).

Zwar ist 24 h nach der Bestrahlung das Kontrolllevel von durchschnittlich einem DSB pro Zellkern noch nicht wieder erreicht, die signifikante Reduktion der 53BP1-Foci zu diesem Zeitpunkt zeigt jedoch deutlich, dass in den Zellen im humanen Hautmodell sowohl die Markierung als auch die Reparatur von DSBs funktioniert.

Nach der Beurteilung der Induktionsfähigkeit, der Dosisabhängigkeit sowie der Reparaturkapazität der humanen Vollhautmodelle erwies sich, dass diese *in vitro*-Hautkultur sehr gut dazu geeignet ist, den Einfluss von NIR auf die durch ionisierende Strahlung hervorgerufene Schadensantwort von Zellen im Gewebeverbund zu untersuchen.

## 4.2. Einfluss naher Infrarotstrahlung auf die röntgeninduzierte Schadensantwort in FTSM

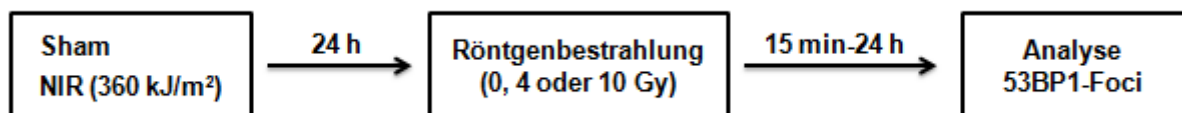
Es ist bekannt, dass eine Vorbestrahlung mit wassergefiltertem Infrarot A (NIR, 0,6-1,2 $\mu$ m, 360 kJ/m<sup>2</sup>) die Antwort von Monolayerzellen auf ionisierende Bestrahlung signifikant verändert [11]. Da Patienten während einer Strahlentherapie durchaus beiden hier verwendeten Strahlenarten ausgesetzt sein können und bei einer solchen Therapie immer auch gesundes Gewebe durch die Bestrahlung betroffen ist, ist es von großer Bedeutung, die Relevanz dieses Effekts auch in Gewebekulturen zu untersuchen. Die Haut als Hüllorgan des Menschen eignet sich hierbei besonders für diese Untersuchung, da alle epidermalen sowie dermalen Zelltypen von beiden Strahlenarten exponiert sein können.

### 4.2.1. DSB-Reparatur nach Doppelbestrahlung

Aus Versuchen mit NIH/3T3-Fibroblasten und HaCaT-Keratinocyten ist bekannt, dass eine Bestrahlung mit wassergefiltertem Infrarot A (NIR, 0,6-1,2 $\mu$ m, 360 kJ/m<sup>2</sup>) 24 h vor einer Röntgenexposition eine erhöhte Persistenz von DNA-Doppelstrangbrüchen in Monolayerzellkulturen zur Folge hat [11]. Da das Verbleiben unreparierter Doppelstrangbrüche zu genomischer Instabilität führen kann, sollte der Einfluss von NIR auf diesen Endpunkt im Gewebe untersucht werden.

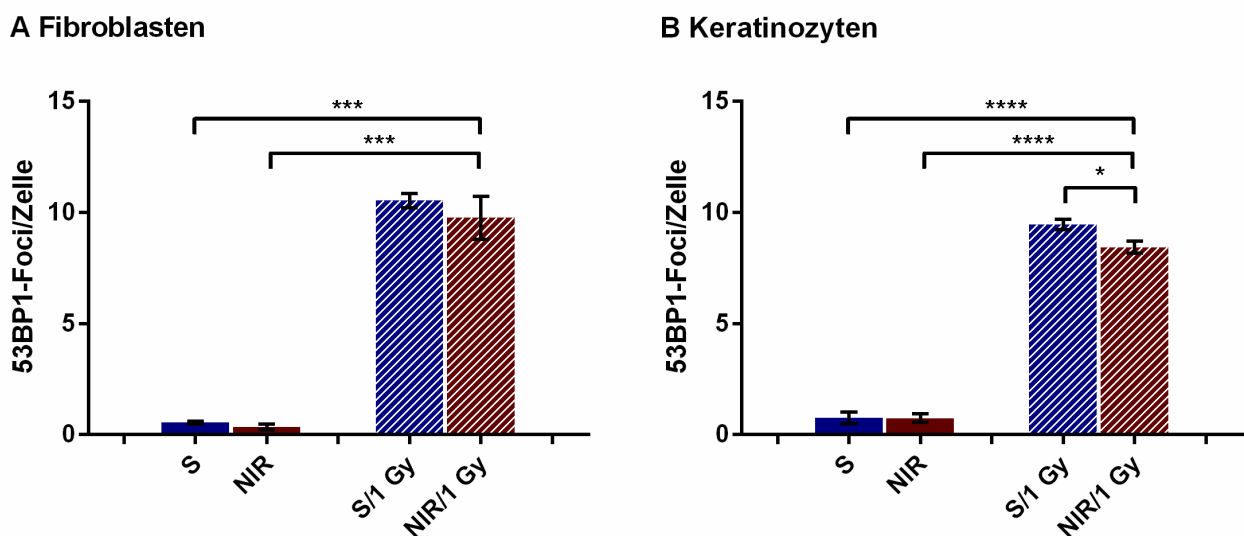
Für diese Untersuchung wurden humane Vollhautmodelle (FTSM) mit NIR und 24 h später mit therapierelevanten Röntgendosen bestrahlt. Bei jedem Versuch wurde eine unbestrahlte Kontrolle (Sham, S) mitgeführt. Um eine mögliche DSB-induzierende Wirkung der nahen Infrarotstrahlung auszuschließen, wurde pro Versuch ein Modell nur mit NIR bestrahlt. Eine weitere Kontrolle für den NIR-Effekt auf die Schadensantwort nach ionisierender Strahlung war ein ausschließlich mit Röntgen bestrahltes Modell (S/Röntgen). Eine weitere Probe wurde mit beiden Strahlenarten in der oben beschriebenen Kombination bestrahlt (NIR/Röntgen).

#### Versuchsaufbau:



Zur Untersuchung des Einflusses von NIR auf die Induktion von DSBs wurden die FTSM 15 min nach der Röntgenbestrahlung mit 1 Gy fixiert. Die Bestimmung des DSB-Levels wurde mittels 53BP1-Focianalyse durchgeführt.

NIR alleine hat in keinem der beiden untersuchten Zelltypen eine DSB-induzierende Wirkung (Abbildung 22, A, B, S vs. NIR). Hingegen führt die Röntgenbestrahlung sowohl in den vorbestrahlten als auch in den nicht mit NIR vorbestrahlten Modellen zu einem signifikanten Anstieg an 53BP1-markierten DSBs (Abbildung 22, A, B, S vs. S/1 Gy, NIR/1 Gy). Während NIR in den Fibroblasten keinen signifikanten Einfluss auf die Induktion von 53BP1-Foci durch die Röntgenbestrahlung hat (Abbildung 22, A, S/1 Gy vs. NIR/1 Gy), zeigt sich in den basalen Keratinozyten eine signifikant geringere Anzahl Foci durch die NIR-Vorbestrahlung (Abbildung 22, B, S/1 Gy vs. NIR/1 Gy).



**Abbildung 22: In Keratinozyten (B), nicht aber in den Fibroblasten (A) der humanen Hautmodelle hat die Vorbestrahlung mit NIR einen signifikanten Einfluss auf die Induktion von 53BP1-Foci.**

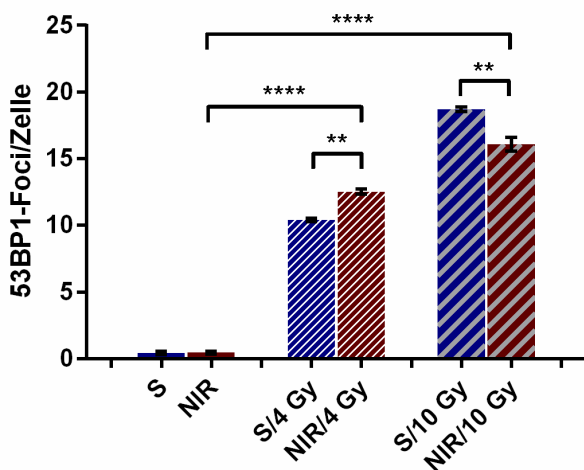
Die Bestrahlung mit NIR alleine hat keinen Einfluss auf das Grundlevel an 53BP1-Foci (S vs. NIR). 15 min nach der Bestrahlung mit 1 Gy zeigen beide Zelltypen eine signifikante Induktion von durchschnittlich zehn 53BP1-Foci pro Zelle (A, B, S vs. S/1 Gy). Auch die mit NIR und 1 Gy bestrahlten Fibroblasten und Keratinozyten weisen signifikant mehr 53BP1-Foci auf als die Zellen der Sham-Kontrolle (A, B, S vs. NIR/1 Gy). Während jedoch in doppeltbestrahlten Fibroblasten (A, NIR/1 Gy) eine annähernd gleiche Anzahl Doppelstrangbrüche markiert ist, hat die Vorbestrahlung mit NIR hingegen in Keratinozyten eine signifikant geringere Rate an 53BP1-markierten DSBs zur Folge. Die Werte repräsentieren den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen (n=3, +/- Standardfehler, unpaired two-tailed students t-test CI=95%, \* P<0,05, \*\*\* P<0,001, \*\*\*\* P<0,0001).

Da sich die erhöhte Persistenz unreparierter DSBs in NIH/3T3-Fibroblasten in der Monolayerzellkultur 4 h nach der Röntgenbestrahlung signifikant nachweisen lässt, wurde dieser Zeitpunkt auch für weitere Untersuchungen des durch NIR beeinflussten Reparaturverhaltens in FTSM gewählt.

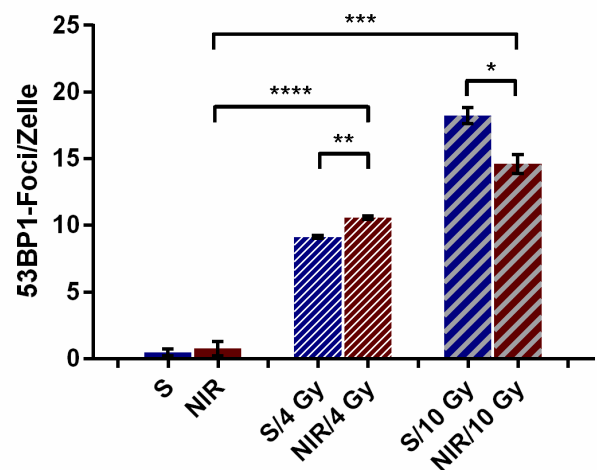
Sowohl die reine Röntgenbestrahlung, als auch die Doppelbestrahlung mit NIR und Röntgenstrahlen hat im Vergleich zur Kontrolle ein signifikant höheres Level unreparierter DSBs in beiden Zellarten des FTSM zur Folge (Abbildung 23, A, B, S vs. S/4 Gy, NIR/4 Gy). Bemerkenswerterweise ist die Modulation der Schadensantwort, die durch Infrarotvorbehandlung auch zu diesem Zeitpunkt auftritt,

abhängig davon, ob 24 Stunden nach der NIR-Bestrahlung 4 oder 10 Gy appliziert wurden. Während die Fibroblasten der humanen Hautmodelle 4 h nach der exklusiven Bestrahlung mit 4 Gy etwa zehn Foci pro Zelle aufweisen, liegt die Anzahl unreparierter DSBs in den mit NIR vorbestrahlten Fibroblasten durchschnittlich bei dreizehn. Auch die Zellkerne der doppeltbestrahlten Keratinozyten weisen zu diesem Zeitpunkt im Mittel zwei Foci pro Zelle mehr auf, als die ausschließlich mit 4 Gy bestrahlten Zellen der Basalschicht. Wurden die Zellen hingegen mit einer höheren Röntgendosis von 10 Gy bestrahlt, kehrt sich dieser Effekt um, die Reparatur der DNA-Schäden scheint dann in beiden Zelltypen beschleunigt abzulaufen. Die ausschließlich mit 10 Gy bestrahlten Fibroblasten weisen 4 h nach 10 Gy im Durchschnitt noch etwa neunzehn unreparierte Doppelstrangbrüche pro Zelle auf, wohingegen in den doppelt bestrahlten Fibroblasten nur noch sechzehn Doppelstrangbrüche pro Zelle nachweisbar sind. Dasselbe Bild zeigt sich auch bei der Quantifizierung der DSBs in den Keratinozyten. In den 4 h nach der Röntgenbestrahlung wurden durch die NIR-Vorbestrahlung durchschnittlich drei Doppelstrangbrüche pro Zellkern mehr repariert.

#### A Fibroblasten



#### B Keratinozyten



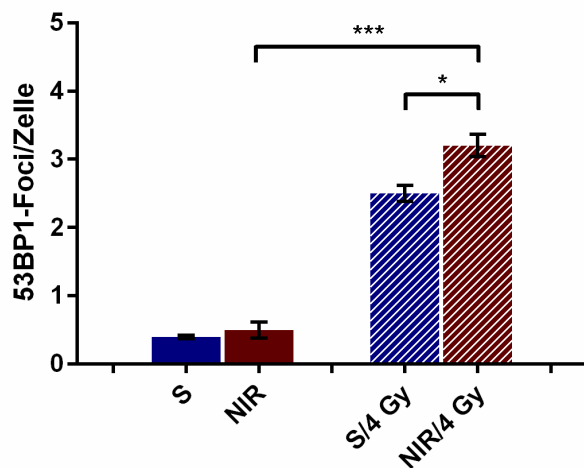
**Abbildung 23: Die Vorbestrahlung mit NIR führt 4 h nach der Bestrahlung mit 4 Gy zu einer signifikant höheren Persistenz unreparierter DSBs in FTSM, dieser reparaturhemmende NIR-Effekt kehrt sich jedoch bei 10 Gy um.**

Sowohl 4 Gy als auch 10 Gy führen zu einer dosisspezifischen Erhöhung des 53BP1-Foci-Niveaus in humanen Hautmodellen (A, B, S/4, S/10). Zellen, die mit NIR und 4 Gy bestrahlt wurden, zeigen 4 h nach der Bestrahlung mit dieser Röntgendosis eine signifikante Hemmung der DSB-Reparatur (A, B, S/4 Gy vs. NIR/4 Gy). In den Fibroblasten werden durch die Vorbestrahlung mit NIR etwa drei Doppelstrangbrüche pro Zelle weniger repariert (A, S/4 Gy vs. NIR/4 Gy), in den basalen Keratinozyten sind es etwa zwei (B, S/4 Gy vs. NIR/4 Gy). Die Bestrahlung mit NIR und 10 Gy hingegen führt in beiden Zelltypen zu einer signifikanten Verbesserung der Reparatur von DSBs (A, B, S/10 Gy vs. NIR/10 Gy). So wurden in den mit NIR und 10 Gy bestrahlten Fibroblasten und Keratinozyten jeweils durchschnittlich drei Doppelstrangbrüche pro Zelle mehr repariert, als in den nur mit 10 Gy bestrahlten Zellen. Die Werte repräsentieren den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen (n=3, +/- Standardfehler, unpaired two-tailed students t-test CI=95%, \* P<0,05, \*\* P<0,01, \*\*\* P<0,001, \*\*\*\* P<0,0001).

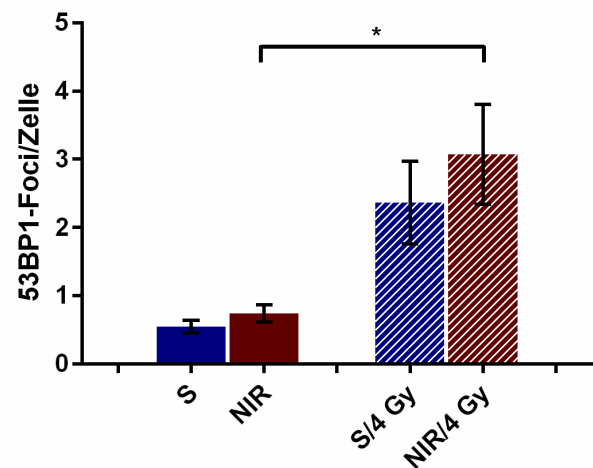
Zur Untersuchung des NIR-Einflusses auf die tatsächliche Reparaturkapazität der humanen Hautmodelle wurden FTSM mit 4 Gy Röntgen bestrahlt und nach 24 h fixiert.

Wie bereits in 4.1.1 erwähnt, ist die Reparatur der beiden Zelltypen der FTSM 24 h nach der Bestrahlung mit 4 Gy zwar noch nicht vollständig abgeschlossen, verglichen mit Abbildung 23 ist das Level der verbleibenden DSBs jedoch von ca. zehn DSBs pro Zelle auf durchschnittlich 2,5 gesunken (Abbildung 24, A, B, S vs. S/4 Gy). Auch 48 h nach der reinen NIR-Bestrahlung hat diese Strahlenart keine DSB-induzierende Wirkung (Abbildung 24, A, B, S vs. NIR). Fibroblasten, die mit beiden Strahlenarten behandelt wurden, weisen 24 h nach der Röntgenbestrahlung weiterhin einen signifikanten Reparaturdefekt auf (Abbildung 24, A, S/4 Gy vs. NIR/4 Gy). In den untersuchten Keratinozyten zeigt sich zwar im Mittel immer noch eine geringere Reparaturkapazität nach der Doppelbestrahlung (Abbildung 24, B, S/4 Gy vs. NIR/4 Gy), jedoch ist diese durch starke Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchen nicht signifikant.

**A Fibroblasten**



**B Keratinozyten**



**Abbildung 24:** 24 h nach der Bestrahlung mit 4 Gy zeigt sich in NIR vorbestrahlten Fibroblasten (A) nach wie vor ein signifikant höheres 53BP1-Foci Level, wohingegen sich dieses in Keratinozyten (B) nur noch tendenziell zeigt.

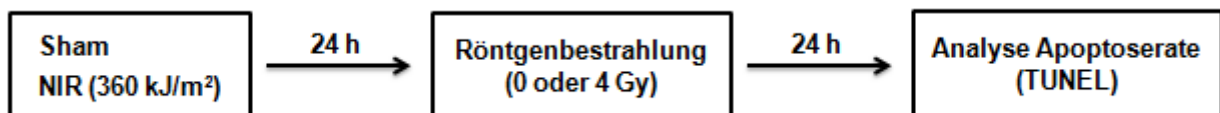
Deutlich zeigt sich, dass sowohl die nicht vorbestrahlten als auch die mit Infrarot vorbestrahlten FTSM 24 h nach der Röntgenbestrahlung immer noch ein signifikant höheres Level an 53BP1-Foci aufweisen als die unbestrahlten Kontrollen (A, B, S, NIR vs. S/4 Gy, NIR/4 Gy). In den Fibroblasten zeigt sich, dass NIR auch zu diesem Zeitpunkt noch eine signifikante Verzögerung der DSB-Reparatur nach 4 Gy zur Folge hat (A, S/4 Gy vs. NIR/4 Gy). In den Keratinozyten hingegen ist dieser Reparaturdefekt nur noch als Trend zu erkennen (B, S/4 Gy vs. NIR/4 Gy). Die Werte stellen den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen dar (n=3, +/- Standardfehler, unpaired two-tailed students t-test CI=95%, \* P<0,05, \*\*\* P<0,001).

#### 4.2.2. Wirkung von NIR auf die röntgeninduzierte Apoptoserate in FTSM

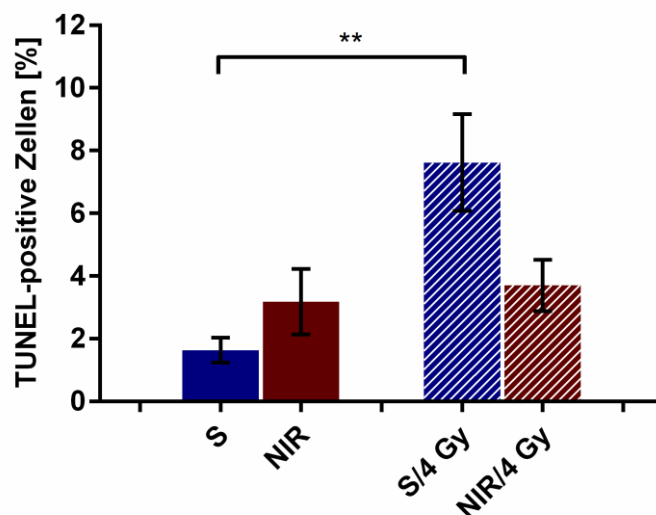
Zellen, die durch ionisierende Strahlung so stark geschädigt wurden, dass die zur Verfügung stehenden Reparaturkaskaden den Schaden nicht beheben können, aktivieren eine intrinsische Proteinkaskade, die zum Zelltod, der sogenannten Apoptose, führt [59]. Da durch die kombinierte Bestrahlung aus NIR und Röntgen in den im FTSM integrierten Fibroblasten eine erhöhte Persistenz von DNA-Schäden nachgewiesen werden konnte, wurde im Folgenden untersucht, ob dieses erhöhte Schadenslevel möglicherweise einen Einfluss auf die durch Röntgenstrahlung induzierte Apoptoserate hat.

FTSM wurden nach dem bekannten Bestrahlungsschema (S, NIR, S/4 Gy, NIR/4 Gy) behandelt und 24 h nach der Röntgenbestrahlung fixiert. Zum Nachweis wurden apoptotische Zellen mit Hilfe der *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*-Methode (TUNEL) markiert und mikroskopisch detektiert. Bestimmt wurde der prozentuale Anteil der TUNEL-positiven Fibroblasten in der Dermis der FTSM.

##### Versuchsaufbau:



Das endogene Level TUNEL-positiver Fibroblasten liegt unter 2%. Die Bestrahlung mit NIR alleine scheint diese endogene Apoptoserate minimal zu erhöhen (Abbildung 25, S vs. NIR). In den mit 4 Gy bestrahlten FTSM kommt es durch die Bestrahlung mit 4 Gy zu einem signifikanten Anstieg der TUNEL-positiven Fibroblasten (Abbildung 25, S vs. S/4 Gy). Interessanterweise führt die Vorbestrahlung mit NIR dazu, dass die Induktion der Apoptose durch die anschließende Röntgenbestrahlung deutlich, jedoch nicht signifikant vermindert ist (Abbildung 25, S/4 Gy vs. NIR/4 Gy).



**Abbildung 25:** Durch ionisierende Strahlung kommt es zu einem signifikanten Anstieg TUNEL-positiver Fibroblasten im FTSM, die Vorbestrahlung mit NIR hingegen führt zu einer verminderten Anzahl dieser röntgeninduzierten Apoptosen. Das endogene Level apoptotischer Fibroblasten in der Dermis der humanen Vollhautmodelle liegt unter 2%. Die Bestrahlung mit NIR alleine erhöht dieses Level auf 3%. Während die Bestrahlung mit 4 Gy zu einer Vervielfachung der TUNEL-positiven Zellen führt, sind in der Dermis der doppeltbestrahlten FTSM im Vergleich deutlich weniger Apoptosen detektierbar. Die Werte stellen den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen dar (n=5, +/- Standardfehler, unpaired two-tailed students t-test CI=95%, \*\* P<0,01, P (S/4 Gy vs. NIR/4 Gy)= 0,055).

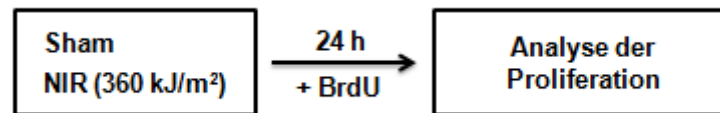
#### 4.2.3. Einfluss von NIR und Röntgenstrahlen auf das Proliferationsverhalten von Zellen im FTSM

Sowohl Infrarot- (NIR, 360 kJ/m<sup>2</sup>) als auch ionisierende Strahlung haben einen hemmenden Einfluss auf das Proliferationsverhalten von dermalen Zellen im Monolayer [11]. Kombiniert man jedoch die Bestrahlung mit NIR und Röntgen, hebt die Vorbestrahlung mit NIR die hemmende Wirkung der Röntgenbestrahlung in diesen Zellkulturen teilweise auf [11]. Statt einer verstärkten Reduktion der Proliferation, welche bei der Kombination zweier proliferationshemmender Einflüsse zu erwarten wäre, wirkt die Vorbestrahlung mit NIR der hemmenden Wirkung der Röntgenstrahlung entgegen.

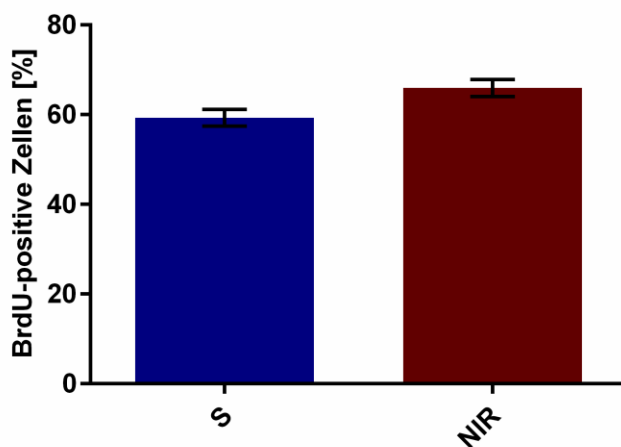
Um zu untersuchen, welchen Einfluss NIR alleine auf die Proliferation der Zellen im humanen Hautmodell hat, wurden FTSM mit 360 kJ/m<sup>2</sup> bestrahlt (NIR) und direkt nach der Bestrahlung unter Zugabe des Basenanalogs BrdU weiterkultiviert. Nach einer 24-stündigen Inkubation unter Kulturbedingungen wurden die Modelle fixiert und die BrdU-Aufnahmerate der Zellen mittels BrdU-Antikörperfärbung nachgewiesen. Um mögliche Veränderungen der Proliferationsrate auf die Bestrahlung mit NIR zurückführen zu können, wurde bei jedem Versuch ein unbestrahltes Modell als Kontrolle (S) mitgeführt. Quantifiziert wurde der prozentuale Anteil BrdU-positiver Zellkerne im *Stratum Basale* der Epidermis, da sich in dieser Schicht die Keratinozyten befinden, welche noch die Fähigkeit zur Zellteilung haben (Abbildung 3).



## Versuchsaufbau:



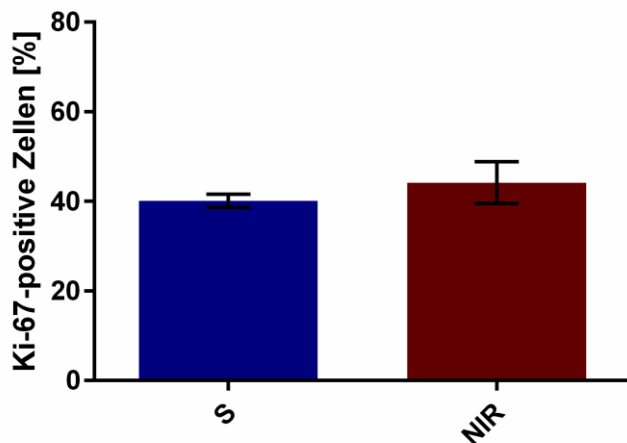
Bei der Quantifizierung der BrdU-positiven Keratinozyten lässt sich, anders als in der Monolayerzellkultur, ein proliferationsfördernder Trend durch die Bestrahlung mit nahem Infrarot detektieren (Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Die Bestrahlung mit wassergefiltertem Infrarot A hat keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation der basalen Keratinozyten im humanen Hautmodell.

Detektiert wurden BrdU-positive Zellkerne im *Stratum Basale* der humanen Hautmodelle. Die Modelle wurden direkt nach der NIR-Bestrahlung für 24 h mit BrdU inkubiert. Hierbei zeigt sich durch die Bestrahlung mit NIR ein Anstieg der proliferierenden Zellen um 11%. Die Werte repräsentieren den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen (n=3, +/- Standardfehler, unpaired two-tailed students t-test CI=95%, P=0,07).

Desweiteren wurde untersucht, ob durch die Bestrahlung mit NIR das Level Ki-67-positiver Zellkerne beeinflusst wurde. Das Protein Ki-67 dient hierbei als Marker für Zellen, die sich aktiv im Zellzyklus befinden, da das Protein nur in diesen Zellen exprimiert wird (Abbildung 3). Auch hier wurden Modelle mit NIR bestrahlt und im Anschluss 24 h weiterkultiviert (NIR). Zum Vergleich wurden Modelle mitgeführt, die nicht mit Infrarot bestrahlt wurden (S). Ki-67 wurde immunhistochemisch nachgewiesen und der prozentuale Anteil der positiven Zellen im *Stratum Basale* bestimmt. Genau wie auf den Einbau von BrdU hat die Bestrahlung mit NIR keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl Ki-67 exprimierender Keratinozyten (Abbildung 27).



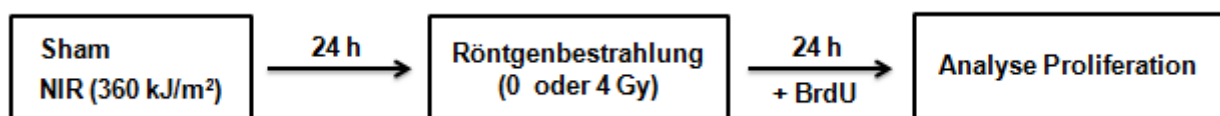
**Abbildung 27: NIR hat keinen signifikanten Einfluss auf die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 in basalen Keratinozyten.**

Im Durchschnitt exprimieren 40% der Keratinozyten im *Stratum Basale* der FTSM den Proliferationsmarker Ki-67 (S), 24 h nach der Bestrahlung mit wassergefiltertem nahem Infrarot sind es 44% (NIR). Die Werte repräsentieren den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen (n=2, +/- Standardabweichung).

Mit Hilfe dieser Versuche konnte geklärt werden, dass 24 h nach der Infrarotexposition, also zum Zeitpunkt der Röntgenbestrahlung nach dem üblichen Versuchsaufbau, der Anteil der Zellen, die sich aktiv im Zellzyklus befinden, nahezu unverändert ist.

Zur Untersuchung, ob die Infrarotvorbestrahlung trotz der fehlenden proliferationshemmenden Wirkung, die diese Strahlung im Monolayer hat, Einfluss auf die Reduktion der Proliferation durch die Röntgenbestrahlung nimmt, wurden FTSM mit NIR und 24 h später mit 4 Gy bestrahlt (NIR/4 Gy). Im Anschluss an die Röntgenbestrahlung wurde den Modellen BrdU zugegeben und diese im Inkubator für 24 h weiterkultiviert. Als Kontrolle wurden bei jedem Versuch Modelle mitgeführt, die unbestrahlt blieben (S). Zur Klärung des reinen Infrarot-, bzw. Röntgeneffekts wurden Modelle entweder nur mit NIR (NIR) oder nur mit 4 Gy (S/4 Gy) bestrahlt. Quantifiziert wurde der prozentuale Anteil der BrdU-positiven Zellkerne im *Stratum Basale* der humanen Vollhautmodelle.

#### Versuchsaufbau:

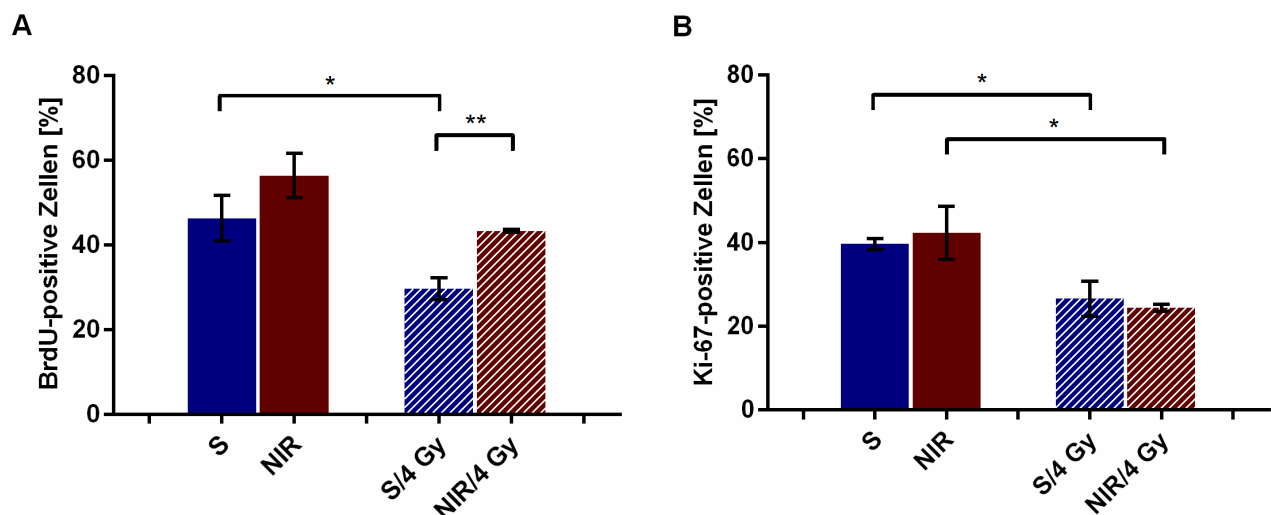


Auch 48 h nach der Infrarot A-Bestrahlung ist die BrdU-Aufnahmerate in den basalen Keratinozyten weiterhin tendenziell erhöht (Abbildung 28, A, S vs. NIR). Durch die exklusive Bestrahlung mit ionisierender Strahlung wird diese jedoch, wie erwartet, signifikant reduziert (Abbildung 28, A, S vs. S/4 Gy). Wurden die FTSM mit beiden Strahlenarten in Kombination bestrahlt, so zeigt sich derselbe Effekt, wie für die Monolayerzellkultur beschrieben. Die Anzahl BrdU-positiver Zellkerne der doppeltbestrahlten Keratinozyten ist im Vergleich zu denen, die gar nicht oder nur mit NIR bestrahlt

wurden, zwar ebenfalls gesenkt (Abbildung 28, A, S, NIR vs. NIR/4 Gy), liegt jedoch signifikant höher als die der ausschließlich mit Röntgenstrahlung bestrahlten FTSM (Abbildung 28, A, S/4 Gy vs. NIR/4 Gy).

Zur Klärung der Frage, ob dieser Effekt durch die Veränderung der Anzahl teilungsfähiger Zellen erklärbar wäre, wurden FTSM mit NIR und nach 24 h zusätzlich mit 4 Gy bestrahlt, weitere 24 h später wurden die humanen Hautmodelle fixiert. Es wurden die üblichen Kontrollen mitgeführt. Zellen, die sich im Zellzyklus befinden, wurden immunhistochemisch über Ki-67 nachgewiesen. Bestimmt wurde der prozentuale Anteil der teilungsfähigen Keratinozyten im *Stratum Basale*.

Sowohl in den unbestrahlten als auch in den nur mit NIR bestrahlten FTSM befinden sich ca. 40% der basalen Keratinozyten im Zellzyklus. Ionisierende Strahlung und auch die Kombination aus den beiden hier verwendeten Strahlenarten reduziert diese Zellpopulation im *Stratum Basale* der humanen Vollhautmodelle nahezu um die Hälfte.



**Abbildung 28:** Die Bestrahlung mit NIR hat eine proliferationsfördernde Wirkung, die so stark ist, dass auch in den kombiniert bestrahlten Proben ein signifikant höherer Anteil Zellen trotz der ionisierenden Bestrahlung proliferiert (A), die Anzahl Ki-67 positiver Zellen ist jedoch sowohl in den mit 4 Gy als auch in den doppelbestrahlten FTSM reduziert (B).

Während sich auch 48 h nach der NIR-Bestrahlung ein proliferationssteigernder Trend zeigt (A, S vs. NIR), hemmt die Bestrahlung mit 4 Gy in den ersten 24 h nach der Röntgenbestrahlung signifikant die Proliferation der basalen Keratinozyten (A, S vs. S/4 Gy). Diesem proliferationshemmenden Effekt der Röntgenstrahlung wirkt in den kombiniert bestrahlten Zellen jedoch die fördernde Wirkung der NIR-Vorbestrahlung entgegen, wodurch in diesen FTSM verglichen mit den ausschließlich mit 4 Gy bestrahlten signifikant mehr BrdU-positive Zellen nachweisbar sind (A, S/4 Gy vs. NIR/4 Gy). Das Verhältnis zwischen S/4 Gy und NIR/4 Gy entspricht dem von S und NIR. NIR alleine erhöht 48 h nach der Bestrahlung tendenziell auch das Level an Ki-67-positiven Zellkernen (B, S vs. NIR), jedoch ist die Anzahl der Ki-67 positiven Zellkerne sowohl in den mit 4 Gy als auch in den mit NIR und 4 Gy bestrahlten Keratinozyten des *Stratum Basale* signifikant gesenkt (B, S vs. S/4 Gy, NIR/4 Gy). Die Werte repräsentieren den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen (n=3, +/- Standardfehler, unpaired two-tailed students t-test CI=95%, \* P<0,05, \*\* P<0,01).

---

## 5. Ergebnisse – molekulare Mechanismen

---

Mit Hilfe der oben beschriebenen Versuche ließ sich zeigen, dass die Bestrahlung mit wassergefiltertem nahem Infrarot A (NIR, 0,6-1,2  $\mu\text{m}$ , 360  $\text{kJ/m}^2$ ) auch im Gewebe die Antwort von Zellen auf eine Bestrahlung mit verschiedenen Röntgendosen beeinflusst. Parallel sollte in Monolayerzellkulturen untersucht werden, welche molekularen Mechanismen durch die Vorbestrahlung beeinflusst werden.

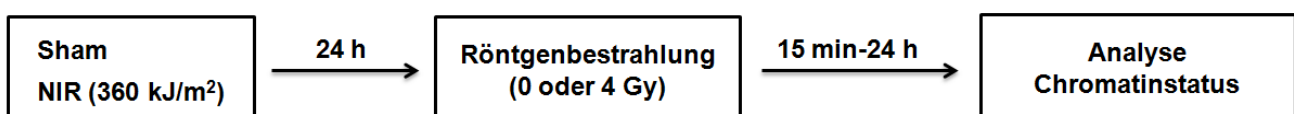
### 5.1. Einfluss von NIR und ionisierender Strahlung auf den Chromatinstatus von Zellen

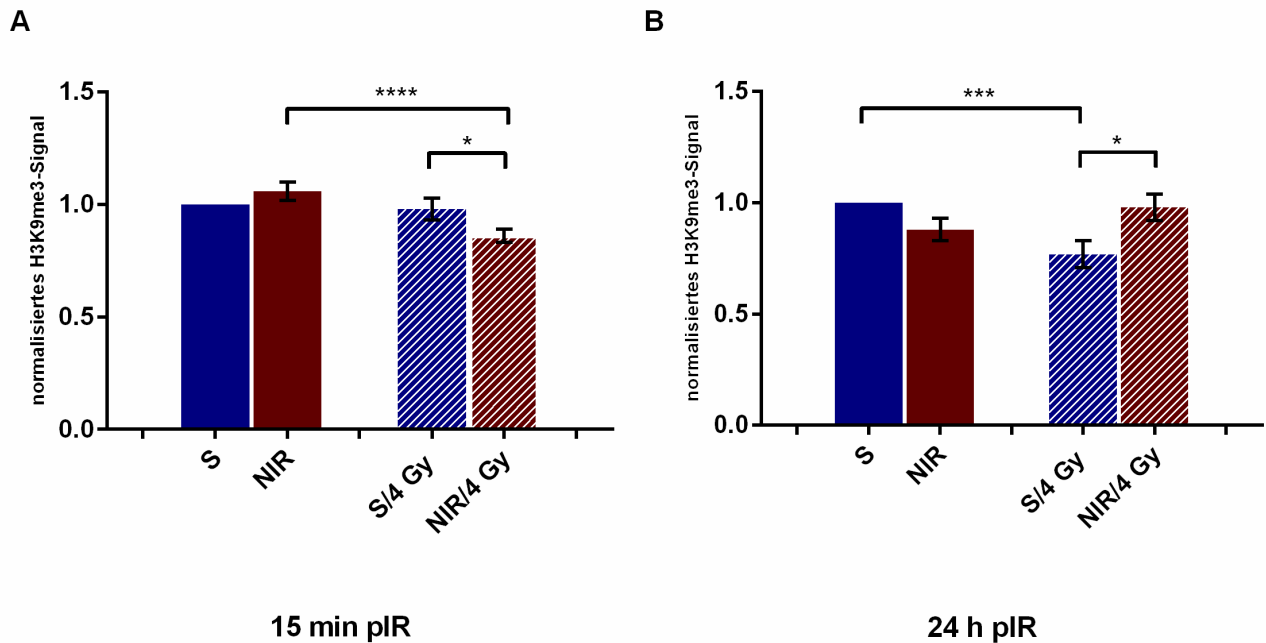
Die Reparatur von strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen gliedert sich, unabhängig von der Zellzyklusphase, in der sich die Zelle befindet, in eine schnelle und eine langsame Komponente. So werden in den ersten 4 Stunden nach der Bestrahlung durchschnittlich 85% aller DSBs durch die Proteine der schnellen Komponente repariert, während die verbleibenden 15% in den folgenden Stunden durch die ATM-abhängigen Reparaturmechanismen der langsamen Komponente repariert werden [99]. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die DSBs, die mit langsamer Kinetik repariert werden, vornehmlich im Heterochromatin der Zellen lokalisiert sind [99, 101, 102].

Da sowohl in der Monolayerzellkultur als auch in den Hautmodellen durch die Vorbestrahlung mit wassergefiltertem nahem Infrarot A eine verzögerte Reparatur von röntgeninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) beobachtet werden konnte, sollte zum einen untersucht werden, ob die Bestrahlung mit NIR möglicherweise einen Einfluss auf den Chromatinstatus der Zellen hat und zum anderen, ob die Vorbestrahlung mit NIR röntgeninduzierte Chromatinmodulationen verändert.

Hierfür wurden NIH/3T3-Zellen als Monolayer auf Coverslips kultiviert. Während der Bestrahlung mit NIR wurden Sham-Kontrollen mitgeführt, welche nicht mit nahem Infrarot bestrahlt wurden. 24 h nach der NIR-Bestrahlung wurden eine Sham-Kontrolle (S/4 Gy) sowie eine mit NIR vorbestrahlte Probe (NIR/4 Gy) mit 4 Gy bestrahlt, für die Untersuchung des reinen NIR-, bzw. Röntgeneffekts blieb jeweils eine mit nahem Infrarot bestrahlte Probe (NIR) und eine Sham-Kontrolle (S) ohne zusätzliche Röntgenbestrahlung. Untersucht wurde im Folgenden der Chromatinstatus der Zellen 15 min und 24 h nach der Röntgenbestrahlung über den immunhistochemischen Nachweis des Heterochromatinmarkers H3K9me3.

#### Versuchsaufbau:





**Abbildung 29: NIR sowie die Kombination aus NIR und Röntgenstrahlen beeinflusst den Heterochromatinstatus von NIH/3T3-Zellen.**

Der Heterochromatinanteil der Zellen wurde bildanalytisch über die Fluoreszenzintensität des Heterochromatinmarkers H3K9me3 bestimmt. Zum Zeitpunkt der Röntgenbestrahlung ist das H3K9me3-Level in den ausschließlich mit NIR bestrahlten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen um 6% erhöht (A, S vs. NIR). Zu diesem frühen Zeitpunkt nach der Röntgenbestrahlung zeigt sich durch die reine Bestrahlung mit 4 Gy noch keine Modulation des Heterochromatinmarkers (A, S vs. S/4 Gy). Die doppeltbestrahlten Zellen hingegen zeigen schon zu diesem Zeitpunkt eine signifikante Verminderung von H3K9me3 (A, S/4 Gy vs. NIR/4 Gy). Weitere 24 h später weisen die mit NIR bestrahlten Zellen verglichen mit der Sham-Kontrolle 12% weniger H3K9me3 auf (B, S vs. NIR). Die Bestrahlung mit 4 Gy reduziert das H3K9me3-Level in diesem Zeitraum sogar signifikant um fast ein Drittel (B, S vs. S/4 Gy). Das H3K9me3-Level der doppeltbestrahlten Zellen entspricht 24 h nach der Bestrahlung nahezu dem der Kontrolle. Die Werte repräsentieren den normierten Mittelwert der Fluoreszenzintensität des immunhistochemischen Nachweises von H3K9me3 mehrerer einzeln gemessener Zellkerne (A n=22.404, B n=16.470) aus sieben unabhängigen Versuchen. (n=7, +/- Standardfehler, unpaired two-tailed students t-test CI=95%, \* P<0,05, \*\*\* P<0,001, \*\*\*\* P<0,0001).

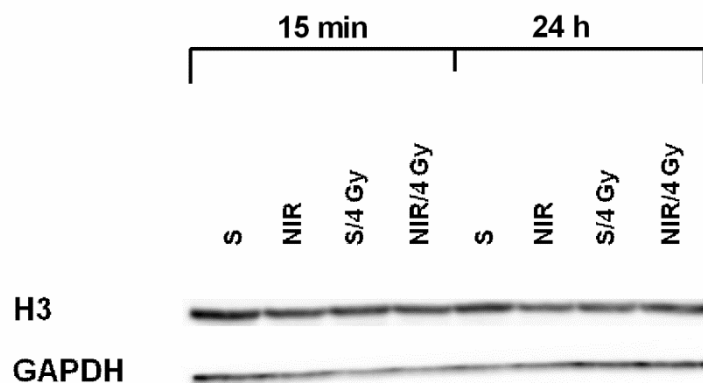
24 h nach der Bestrahlung mit wassergefiltertem Infrarot A ist das H3K9me3-Signal in den bestrahlten Zellen um 6% erhöht, was bedeutet, dass die Zellen, die mit NIR bestrahlt wurden, tatsächlich zum Zeitpunkt der Röntgenbestrahlung ein leicht erhöhtes Heterochromatinlevel aufweisen (Abbildung 29, A, S vs. NIR). Die ausschließliche Bestrahlung mit ionisierender Strahlung verursacht in den ersten 15 min nach der Bestrahlung noch keine detektierbare Modulation des H3K9me3-Levels (Abbildung 29, A, S vs. S/4 Gy). Bemerkenswerterweise ist in den doppeltbestrahlten Zellen schon zu diesem frühen Zeitpunkt nach der Röntgenbestrahlung das Signal des Heterochromatinmarkers H3K9me3 signifikant geringer als in den nur mit Röntgen bestrahlten NIH/3T3-Zellen (Abbildung 29, A, S/4 Gy vs. NIR/4 Gy).

Nach weiteren 24 h, also 48 h nach der Bestrahlung mit Infrarot, ist das H3K9me3-Level in den nur mit NIR bestrahlten Zellen deutlich, jedoch nicht signifikant, herunter reguliert (Abbildung 29, B,

S vs. NIR). Die Bestrahlung mit 4 Gy führt zu einer signifikanten Reduktion des H3K9me3-Signals (Abbildung 29, B, S vs. S/4 Gy), die Vorbestrahlung mit NIR hingegen führt dazu, dass die doppeltbestrahlten Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits nahezu das Kontrolllevel wieder erreicht haben (Abbildung 29, B, S vs. NIR/4 Gy).

Da sich bei der Untersuchung des Heterochromatinmarkers H3K9me3 zeigte, dass sowohl NIR als auch die Doppelbestrahlung einen Einfluss auf die methylierte Form des Histons H3 hat, wurde nachfolgend untersucht, ob es sich bei den beobachteten Effekten tatsächlich um einen Einfluss auf die posttranslationale Modifikation des Histons handelt, welche zur Verdichtung des Chromatins führt, oder ob das Expressionslevel des Histons H3 an sich beeinflusst wird.

Zur Untersuchung der H3-Expression wurden die oben beschriebenen Proben (S, NIR, S/4 Gy, NIR/4 Gy) 15 min, bzw. 24 h nach der Bestrahlung mit ionisierender Bestrahlung für Western Blot-Analysen geerntet. Neben der Expression des Histons H3 wurde als Ladekontrolle das Haushaltsprotein GAPDH nachgewiesen.



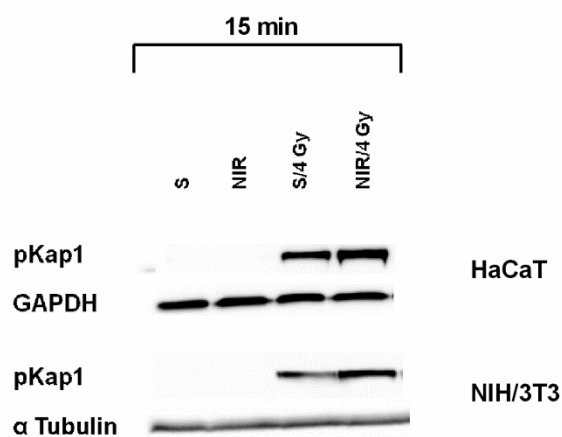
**Abbildung 30: NIR und die kombinierte Bestrahlung aus NIR und 4 Gy haben keinen Einfluss auf die Expression des Histons H3 in NIH/3T3-Zellen.**

Weder 15 min noch 24 h nach der Röntgenbestrahlung mit 4 Gy zeigt die Western Blot-Analyse eine Veränderung der H3-Expression in den mit NIR bestrahlten Zellen. Auch die exklusive Bestrahlung mit 4 Gy sowie die Doppelbestrahlung haben keinen Effekt auf das Expressionsmuster der Histonvariante H3. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus 2 Versuchen, als Ladekontrolle wurde die Expression des Kontrollproteins GAPDH bestimmt.

Bei der Expressionsanalyse des Histons H3 mittels Western Blot zeigt sich, dass keine der durchgeführten Bestrahlungen einen Effekt auf die Expression der Histonvariante hat (Abbildung 30). Die oben beobachteten Effekte (Abbildung 29) sind also *de facto* auf die posttranslationale Methylierung des Histons zurückzuführen.

Durch die erhöhte H3K9-Trimethylierung in NIR bestrahlten Zellen zum Zeitpunkt der anschließenden Röntgenbestrahlung steigt die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen in heterochromatischen Bereichen der DNA. Heterochromatische Brüchen werden unabhängig von der Zellzyklusphase, in der sich die Zellen befinden, über die langsame Komponente repariert. Eine erhöhte Anzahl heterochromatischer Brüchen könnte somit dazu führen, dass mehr Brüchen mit einer langsamen Kinetik repariert werden. Der initiale Schritt der Reparatur heterochromatischer Brüchen ist die Phosphorylierung des Heterochromatin-bildenden Proteins KAP1 an Serin 824 durch die Serin-Threonin-Kinase ATM, welche zur Relaxation des Heterochromatins führt [12].

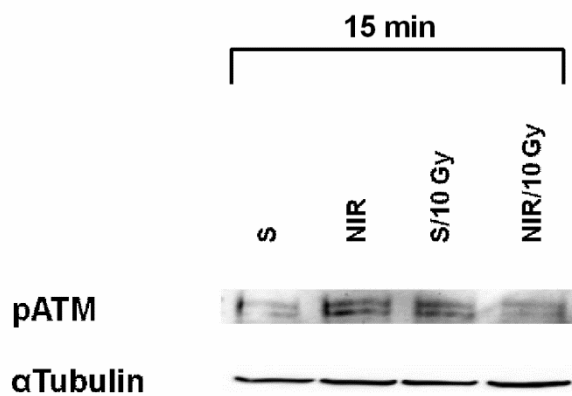
Western Blot-Analysen 15 min nach der Bestrahlung mit 4 Gy zeigen eine deutliche Induktion der phosphorylierten Form von KAP1, sowohl in humanen HaCaT-Zellen als auch in murinen NIH/3T3-Fibroblasten (Abbildung 31, S vs. S/4 Gy). Durch die Vorbestrahlung mit NIR ist das röntgeninduzierte pKAP1-Level in beiden untersuchten Zelllinien sogar noch deutlich erhöht (Abbildung 31, S/4 Gy vs. NIR/4 Gy).



**Abbildung 31: Die Vorbestrahlung mit nahem Infrarot A führt zu einer deutlichen Erhöhung des durch ionisierende Strahlung induzierten pKAP1-Levels.**

Sowohl in HaCaT-Keratinocyten, als auch in NIH/3T3-Fibroblasten wird in den ersten 15 min nach der Bestrahlung mit 4 Gy die Phosphorylierung von KAP1 an Ser824 induziert (S vs. S/4 Gy). Die Vorbestrahlung mit nahem Infrarot A erhöht das Level an pKAP1 im Vergleich zur ausschließlich mit 4 Gy bestrahlten Probe noch einmal deutlich (S/4 Gy vs. NIR/4 Gy). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus n=3 (HaCaT), bzw. n=1 (NIH/3T3), als Ladekontrolle wurde jeweils die Expression des Kontrollproteins GAPDH, bzw. αTubulin bestimmt.

Bei der Untersuchung der an Serin 1981 phosphorylierten und somit aktiven Kinase ATM mittels Western Blot-Analysen zeigt sich, dass diese in NIH/3T3-Zellen schon durch NIR alleine hochreguliert wird (Abbildung 32, S vs. NIR). Diese Hochregulation entspricht in etwa der, die die Bestrahlung mit Röntgen in den ersten 15 min verursacht (Abbildung 32, NIR vs. S/10 Gy). Die Vorbestrahlung mit nahem Infrarot hingegen führt dazu, dass das pATM-Level nahezu auf dem Kontrollniveau verbleibt (Abbildung 32, S vs. NIR/10 Gy).



**Abbildung 32:** Sowohl die Bestrahlung mit nahem Infrarot als auch die Bestrahlung mit 10 Gy führen in NIH/3T3-Zellen zu einer Aktivierung der Serin-Threonin-Kinase ATM, welche in den doppeltbestrahlten Zellen hingegen nahezu ausbleibt.

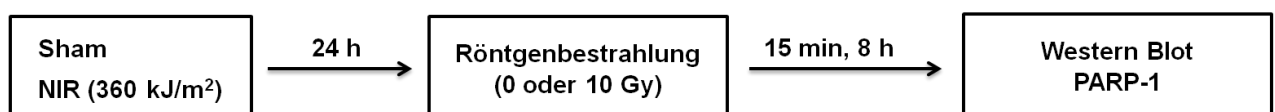
Western Blot-Analysen der an Serin 1981 phosphorylierten ATM-Kinase zeigen, dass 24 h nach der Bestrahlung mit nahem Infrarot das pATM-Level im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht ist (S vs. NIR). Auch die Bestrahlung mit 10 Gy führt 15 min nach der Bestrahlung zu einer Aktivierung von ATM (S vs. S/10 Gy). Die doppeltbestrahlten Proben hingegen zeigen nahezu dasselbe pATM-Level wie die Sham-Kontrolle (S vs. NIR/10 Gy). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Versuchen, als Ladekontrolle wurde die Expression von  $\alpha$ Tubulin bestimmt.

## 5.2. Untersuchung des Expressionslevels von *Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1)* nach kombinierter Bestrahlung

Durch *in vivo*-Versuche mit murinen Hautproben konnte bereits gezeigt werden, dass die Bestrahlung mit nahem Infrarot A 24 h nach der Bestrahlung eine erhöhte *parp1* mRNA-Expression zur Folge hat [199]. Neben seiner Rolle in der Differenzierung sowie der Genregulation [108] ist das aus dieser mRNA resultierende Protein maßgeblich an DNA-Reparaturprozessen beteiligt. Seine Hauptaufgabe hierbei ist die Detektion von sogenannten *DNA-nick-ends* sowie die anschließende Poly(ADP-ribosyl)ierung verschiedener Proteine, die an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sind [111-113]. Durch seine Fähigkeit *nick-ends* zu erkennen, findet man PARP-1 hauptsächlich an Einzelstrangbrüchen [114], jedoch wurde auch eine Beteiligung von PARP-1 an verschiedenen Prozessen der DSB-Reparatur nachgewiesen, hierzu zählt z.B. die Poly(ADP-ribosyl)ierung verschiedener Histonvarianten am DSB [109], aber auch die Aktivierung der Serin-Threonin-Kinase ATM [116].

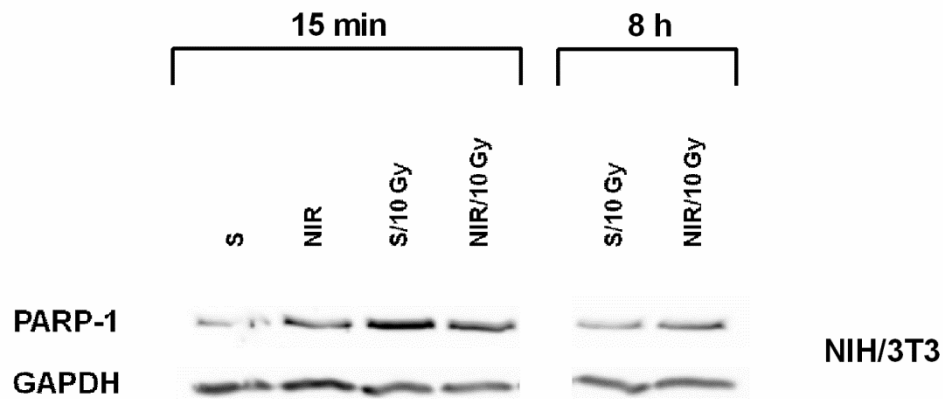
Um zu untersuchen, ob die durch NIR erhöhte Expression von *parp1* sich auch auf Proteinebene zeigt und ob die kombinierte Bestrahlung ebenfalls einen Einfluss auf dieses für die DNA-Reparatur wichtige Protein hat, wurden entsprechende Western Blot-Analysen durchgeführt.

### Versuchsaufbau:





Hierfür wurden NIH/3T3-Fibroblasten mit NIR bestrahlt, bzw. blieben als Sham-Kontrolle unbestrahlt, nach 24 h wurden jeweils eine Sham- sowie eine NIR-Probe mit 10 Gy bestrahlt (S/10 Gy, NIR/10 Gy). Um mögliche Effekte durch die Röntgenbestrahlung beurteilen zu können, blieben jeweils eine mit NIR bestrahlte Probe sowie eine Sham-Kontrolle ohne zusätzliche Röntgenbestrahlung (NIR, S).



**Abbildung 33:** Sowohl NIR als auch Röntgen sowie die Kombination der beide Strahlenarten beeinflussen die Expression von PARP-1, während 15 min nach der Bestrahlung mit 10 Gy das Level in den ausschließlich mit Röntgen bestrahlten NIH/3T3 höher ist als in den doppelbestrahlten, dreht sich dieser Effekt 8 h nach der Bestrahlung um.

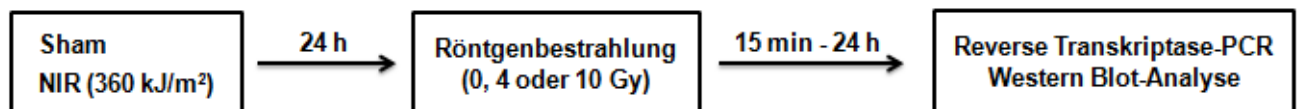
Western Blot-Analysen zeigen, dass 24 h nach der NIR-Bestrahlung das Level an PARP-1 in den bestrahlten Zellen erhöht ist (S vs. NIR). Die Bestrahlung mit 10 Gy führt 15 min nach der Bestrahlung zu einem sehr starken Anstieg des Proteinlevels (S vs. S/10 Gy, 15 min). Auch in den doppeltbestrahlten Zellen zeigt sich zu diesem Zeitpunkt ein Anstieg der Proteinexpression, dieser ist jedoch geringer als in der ausschließlich mit 10 Gy bestrahlten Probe (S/10 Gy vs. NIR/10 Gy, 15 min). 8 h nach der Röntgenbestrahlung ist in der mit 10 Gy bestrahlten Probe das PARP-1-Kontrollniveau bereits wieder so gut wie erreicht, während in der mit NIR und 10 Gy bestrahlten Probe weiterhin mehr PARP-1 nachweisbar ist (S/10 Gy vs. NIR/10 Gy, 8 h). Die Abbildung zeigt für den 15 min-Punkt ein repräsentatives Ergebnis aus 2 von 3 unabhängigen Versuchen, der Effekt des 8 h Punkts zeigt sich in allen drei Versuchen konstant, als Ladekontrolle wurde die Expression von GAPDH bestimmt.

Western Blot-Analysen zeigen, dass die Bestrahlung mit nahem Infrarot A nach 24 h nicht nur eine Erhöhung der *parp1* mRNA-Expression zur Folge hat, sondern dass tatsächlich auch die PARP-1 Proteinmenge deutlich erhöht ist (Abbildung 33, S vs. NIR, 15 min). Die ausschließliche Bestrahlung mit 10 Gy induziert einen sehr starken PARP-1-Anstieg (Abbildung 33, S vs. S/10 Gy, 15 min), auch in den doppeltbestrahlten Zellen steigt das Proteinlevel verglichen mit der Sham an (Abbildung 33, S vs. NIR/10 Gy, 15 min), jedoch deutlich weniger stark, als in den nur mit ionisierender Strahlung bestrahlten NIH/3T3 (Abbildung 33, S/10 Gy vs. NIR/10 Gy, 15 min). Nach 8 h entspricht die Menge an nachweisbarem PARP-1 in der mit 10 Gy bestrahlten Probe annäherungsweise der der Kontrolle (Abbildung 33, S vs. S/10 Gy, 8 h), in den kombiniert bestrahlten Zellen hingegen ist das Level an PARP-1 zu diesem Zeitpunkt noch deutlich höher (Abbildung 33, S/10 Gy vs. NIR/10 Gy, 8 h).

### 5.3. Einfluss von NIR-Vorbestrahlung auf den FOXM1-Signalweg

Die Doppelbestrahlung mit nahem Infrarot und einer 24 h später folgenden Bestrahlung mit Röntgen führt in Monolayerzellkulturen zu einem erhöhten Level genomischer Instabilität, welche sich durch das vermehrte Auftreten *Mitotischer Katastrophen* (MC) zeigt [11]. Der Transkriptionsfaktor FOXM1 ist für die Aktivierung verschiedener proliferations-assoziiierter Gene verantwortlich und leistet dadurch einen großen Beitrag zum Erhalt der genomischen Integrität während des Zellzyklusverlaufs [125]. Ist das Expressionsgleichgewicht dieses Faktors gestört, so kommt es zu Fehlern in den Proteinkaskaden des Zellzykluses, was zu Aneuploidie, Polyploidie und schlussendlich zur *Mitotischen Katastrophe* führen kann [129, 200], wodurch FOXM1 ein interessanter Kandidat für die Klärung des erhöhten MC-Levels nach der kombinierten Bestrahlung mit NIR und Röntgenstrahlung ist.

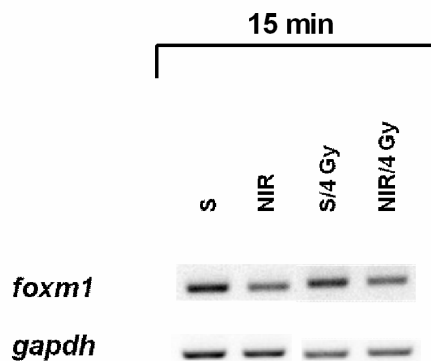
#### Versuchsaufbau:



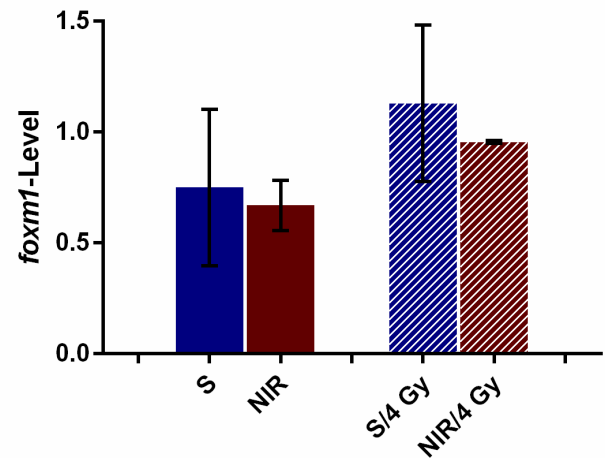
Für die Untersuchung des Transkriptionsfaktors FOXM1 wurden Zellen als Monolayer kultiviert. 24 h nach der Bestrahlung mit NIR wurden die Zellen mit Röntgen bestrahlt und anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten entweder für die Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) oder für Western Blot-Analysen geerntet. Bei jeder Bestrahlung blieben Proben zur Kontrolle unbestrahlt, woraus sich die folgenden Proben ergaben: S, NIR, S/Röntgen und NIR/Röntgen.

Die Bestrahlung mit nahem Infrarot alleine hat zu keinem der untersuchten Zeitpunkte einen Einfluss auf das mRNA-Level von *foxm1* in humanen HaCaT-Keratinocyten (Abbildung 34-36, S vs. NIR). 15 min nach der Bestrahlung mit 4 Gy hingegen hat sich die Expression des Transkriptionsfaktors nahezu verdoppelt (Abbildung 34, S vs. S/4 Gy). Das Expressionslevel in den doppeltbestrahlten Zellen ist ebenfalls verglichen mit der Sham-Kontrolle gestiegen (Abbildung 34, S vs. NIR/4 Gy), jedoch nicht so stark, wie in den ausschließlich mit 4 Gy bestrahlten HaCaT-Zellen (Abbildung 34, S/4 Gy vs. NIR/4 Gy).

A



B

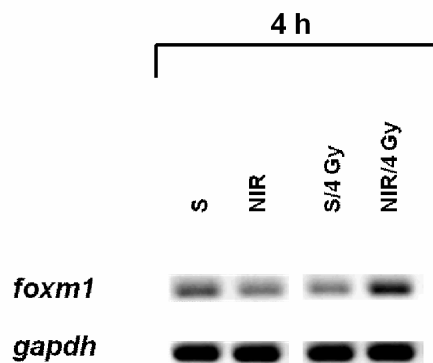


**Abbildung 34:** RT-PCR-Analysen des *foxm1*-Transkriptes zeigen, dass 15 min nach der Bestrahlung mit 4 Gy die Expression des Genes hochreguliert ist, dieser Anstieg der Expression ist in den doppelbestrahlten HaCaTs jedoch geringer.

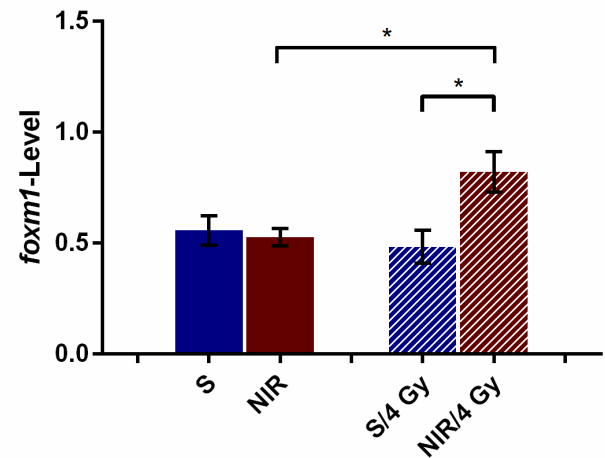
(A) Die Analyse der RT-PCR zeigt einen deutlichen Anstieg der *foxm1*-Transkription durch die Bestrahlung mit 4 Gy (S vs. S/4 Gy), dieser Anstieg fällt in den doppelbestrahlten Zellen deutlich geringer aus (S vs. NIR/4 Gy). (B) Dieser deutliche Anstieg nach ionisierender Strahlung wird in der bildanalytischen Auswertung der RT-PCR mit damit einhergehender Normierung auf das Haushaltsgen *gapdh* deutlich (S vs. S/4 Gy). Auch der sehr viel geringere Anstieg in den doppelbestrahlten Proben spiegelt sich in der Bildanalyse wider (S vs. NIR/4 Gy). Die Werte repräsentieren den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen (n=2, +/- Standardabweichung).

4 h nach der Bestrahlung mit 4 Gy zeigt sich in den exklusiv mit ionisierender Bestrahlung behandelten HaCaT-Zellen keine Regulation der *foxm1*-Expression mehr (Abbildung 35, S vs. S/4 Gy). Das Expressionslevel von *foxm1* ist zu diesem Zeitpunkt jedoch in den mit NIR und 4 Gy bestrahlten Zellen signifikant gestiegen und liegt somit deutlich über dem der nur mit 4 Gy bestrahlten Proben (Abbildung 35, S/4 Gy vs. NIR/4 Gy).

A



B

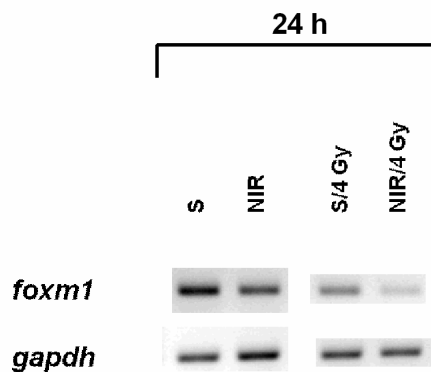


**Abbildung 35: 4 h nach der Bestrahlung mit 4 Gy ist das Expressionslevel von *foxm1* in den doppeltbestrahlten HaCaT-Zellen noch deutlich erhöht.**

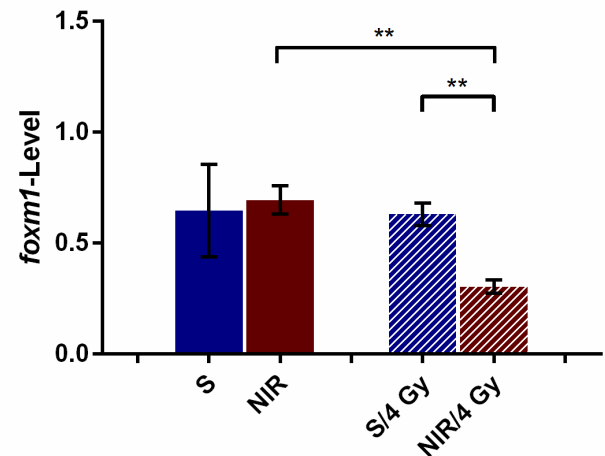
(A) Die Analyse der RT-PCR zeigt, dass 4 h nach der Bestrahlung das Expressionslevel in der mit 4 Gy bestrahlten Probe wieder etwa dem der Sham-Kontrolle entspricht (S vs. S/4 Gy). Die mit NIR und 4 Gy bestrahlten HaCaT-Zellen hingegen weisen zu diesem Zeitpunkt eine deutlich stärkere *foxm1*-Expression auf. (B) Bei der bildanalytischen Auswertung der RT-PCR mit damit einhergehender Normierung auf das Haushaltsgen *gapdh* zeigt sich, dass der Anstieg der *foxm1*-Transkription verglichen mit den ausschließlich mit 4 Gy bestrahlten Proben signifikant ist (S/4 Gy vs. NIR/4 Gy). Die Werte repräsentieren den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen (n=3 +/-Standardfehler, unpaired two-tailed students t-test CI=95%, \* P<0,05).

Nach einer Inkubationszeit von 24 h entspricht das *foxm1*-Expressionslevel in den mit 4 Gy bestrahlten Proben nach wie vor dem der Sham-Kontrolle sowie dem der mit NIR bestrahlten Zellen. Die mit nahem Infrarot A und Röntgen bestrahlten HaCaTs zeigen jedoch nach dieser Zeit im Vergleich zu den Sham-, NIR- und 4 Gy-Proben eine Halbierung der *foxm1*-Transkription.

A



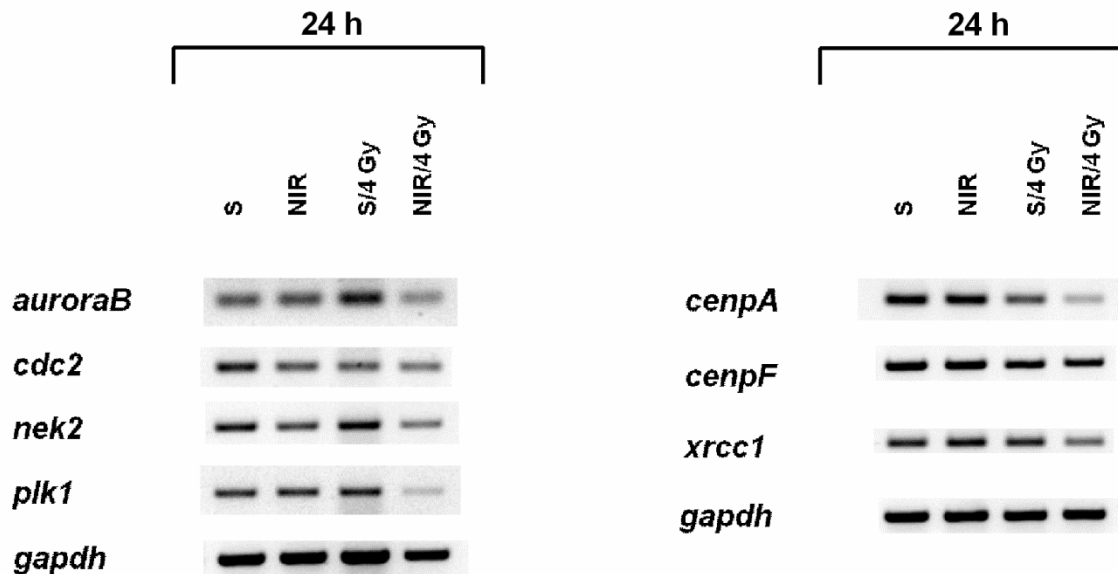
B



**Abbildung 36: Die kombinierte Bestrahlung aus NIR und 4 Gy führt 24 h nach Bestrahlung zu einer signifikant verminderten *foxm1*-Expression.**

(A) Während die Analyse der RT-PCR sowohl für die Sham-, NIR- als auch die 4 Gy-Probe ein etwa gleiches Level an *foxm1*-Transkript zeigt, ist dieses 24 h nach der Bestrahlung mit ionisierender Strahlung deutlich herunter reguliert (S, NIR, S/4 Gy vs. NIR/4 Gy). (B) Die bildanalytische Auswertung zeigt, dass die Expression von *foxm1* durch die Kombination aus NIR und 4 Gy nahezu halbiert ist (S, NIR, 4 Gy vs. NIR/4 Gy). Die Werte repräsentieren den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen (n=3 +/-Standardfehler, unpaired two-tailed students t-test CI=95%, \*\* P<0,01).

Zum Nachweis des Einflusses der kombinierten Bestrahlung auf den FOXM1-Signalweg sollte im Folgenden die Expression verschiedener Gene untersucht werden, deren Transkription über FOXM1 als Transkriptionsfaktor reguliert wird [124, 125]. Zu den untersuchten Genen gehören solche, wie *auroraB*, *cdc2*, *plk1* und *nek2*, die unter expressionsverändernden Bedingungen zur Entstehung *Mitotischer Katastrophen* beitragen können [129, 201].

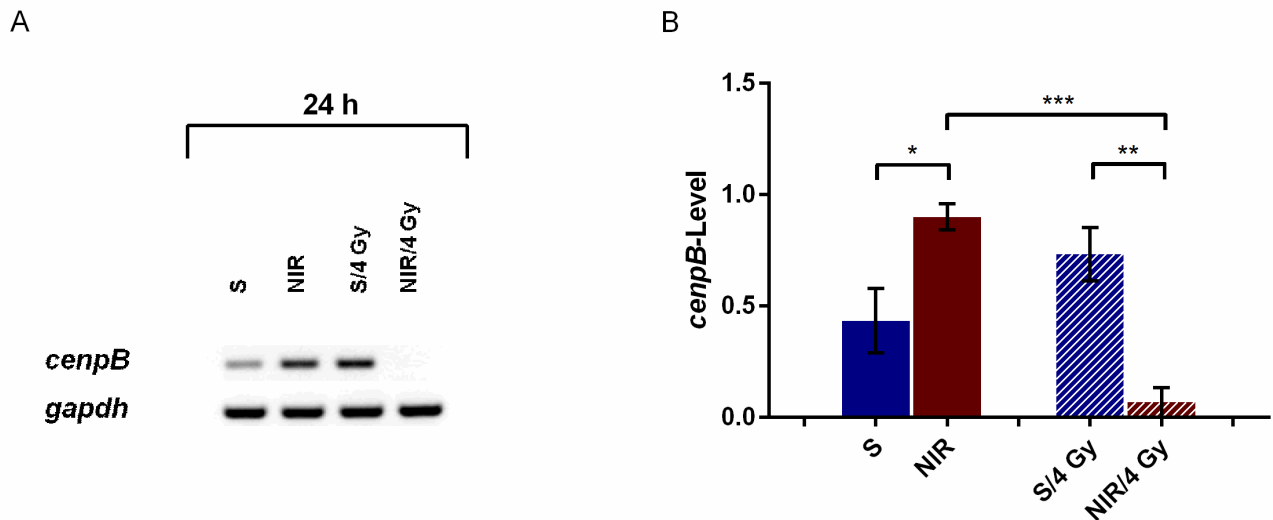


**Abbildung 37:** Die RT-PCR verschiedener durch FOXM1 regulierter Gene zeigt, dass die kombinierte Bestrahlung zu einer Herunterregulation der Transkription dieser Zielgene in HaCaT-Keratinocyten führt.

Die Bestrahlung mit nahem Infrarot A alleine hat 48 h nach der Bestrahlung eine sehr geringe Reduktion der Transkripte von *cdc2* und *nek2* zur Folge. Auf die anderen untersuchten Gene hat die ausschließliche Bestrahlung mit NIR hingegen keinen maßgeblichen Einfluss (S vs. NIR). Die Röntgenbestrahlung mit 4 Gy senkt sowohl das Transkript-Level von *cenpA*, als auch das von *cdc2*. Die Expression der anderen untersuchten Gene wird durch die ionisierende Bestrahlung nicht beeinflusst (S vs. S/4 Gy). NIR in Kombination mit Röntgen hingegen hat eine stark hemmende Wirkung auf die Expression von *auroraB*, *nek2*, *plk1*, *cenpA* sowie *xrcc1*. Eine leicht hemmende Wirkung der kombinierten Bestrahlung zeigt sich bei *cdc2*. Keinen Einfluss hat die kombinierte Bestrahlung auf die Transkription von *cenpF* (S/4 Gy vs. NIR/4 Gy). Die hier dargestellten Aufnahmen der Gelelektrophorese zur Analyse der RT-PCR Produkte zeigen exemplarisch die Effekte, die sich in mehreren unabhängig durchgeführten Versuchen wiederholten (n=3). Als Kontrolle für die Durchführung wurde für jeden Versuch das Haushaltsgen *gapdh* in der RT-PCR mitgeführt.

Bei der Untersuchung der Expression von *auroraB*, *plk1*, *cenpA*, *cenpF* und *xrcc1* zeigte sich, dass die Bestrahlung mit NIR nach 48 h keinen Einfluss auf die Expression dieser Gene hat (Abbildung 37, S vs. NIR). Die Untersuchung des Transkript-Levels von *cdc2* und *nek2* zeigen jedoch eine leichte Reduktion durch die ausschließliche Bestrahlung mit NIR. Die Bestrahlung mit 4 Gy senkt die Expression von *cenpA* und *cdc2* (Abbildung 37, *cenpA*, *cdc2* S vs. S/4 Gy), hat auf die Expression der anderen untersuchten Gene jedoch keinen Einfluss. Die Bestrahlung mit NIR 24 h vor der Bestrahlung mit 4 Gy führt bei allen untersuchten Genen zu einer deutlichen Hemmung der Expression (Abbildung 37, S vs. NIR/4 Gy), lediglich auf das Transkript-Level von *cenpF* hat diese Kombination der zwei Strahlenarten keinen Einfluss (Abbildung 37, *cenpF*, S vs. NIR/4 Gy). Neben den oben genannten Genen wurde auch die Expression von *cenpB* untersucht, bei der der expressionshemmende Effekt der kombinierten Bestrahlung besonders deutlich ist. Die kombinierte Bestrahlung aus NIR und 4 Gy führt bei diesem Gen nicht nur zu einer Verringerung der Expression, sondern reduziert die Transkription fast vollständig (Abbildung 38, A, B, NIR/4 Gy). Jedoch haben auch die anderen

Bestrahlungsarten eine starke Wirkung auf die Expression dieses Gens. Sowohl die ausschließliche Bestrahlung mit NIR als auch die mit 4 Gy zeigen jedoch einen sehr stark expressionsfördernden Effekt (Abbildung 38, A, B, S vs. NIR, S/4 Gy).

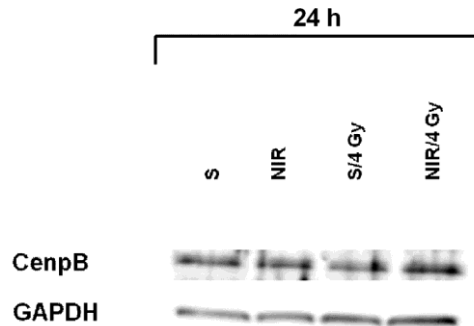


**Abbildung 38: Die Bestrahlung mit nahem Infrarot A und 4 Gy führt 24 h nach der ionisierenden Strahlung zu einer fast vollständigen Inhibition der Transkription von *cenpB*.**

(A) Die Analyse der RT-PCR zeigt einen starken Anstieg des *cenpB*-Levels in HaCaTs durch die ausschließliche Bestrahlung mit NIR (S vs. NIR), auch die Bestrahlung mit 4 Gy Röntgen führt zu einer erhöhten Expression (S vs. S/4 Gy). In der kombiniert bestrahlten Probe ist *cenpB* hingegen nahezu nicht nachweisbar (NIR/4 Gy). (B) Die bildanalytische Auswertung zeigt, dass die Bestrahlung mit NIR das Level an *cenpB*-Transkript verdoppelt (S vs. NIR). Durch die Bestrahlung mit ionisierender Strahlung kommt es zu einer Steigerung der Expression um 60%. Die Bildanalyse der kombiniert bestrahlten Proben zeigt, dass der Effekt der fast vollständigen Reduktion des *cenpB*-Transkripts im Vergleich zur ausschließlich mit Röntgen bestrahlten Probe hoch signifikant ist. Die Werte repräsentieren den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen (n=3 +/-Standardfehler, unpaired two-tailed students t-test CI=95%, \* P<0,05, \*\* P<0,01, \*\*\* P<0,001).

Im Anschluss an die Untersuchung der Genexpression von *cenpB* sollte geklärt werden, ob sich die vollständige Reduktion des Transkripts zu diesem Zeitpunkt auch auf Proteinebene zeigt.

Western Blot-Analysen von *cenpB* zeigen jedoch, dass die gravierenden Veränderungen, die durch die verschiedenen Bestrahlungsarten auf mRNA-Ebene hervorgerufen wurden, 24 h nach der Bestrahlung noch keinen Einfluss auf die Proteinsynthese haben (Abbildung 39).

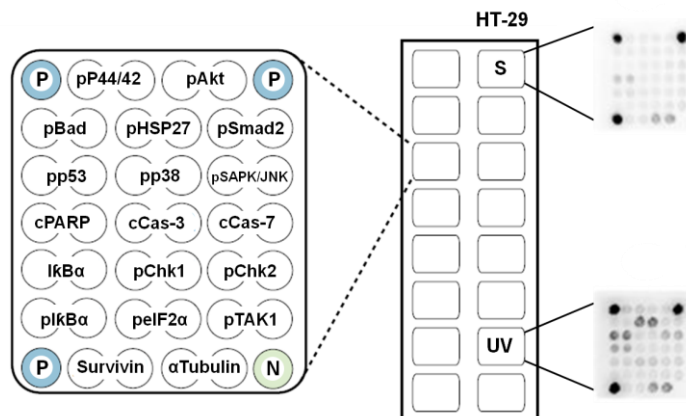


**Abbildung 39:** Keine der Bestrahlungsarten zeigt 24 h nach der ionisierenden Bestrahlung einen Einfluss auf das Proteinlevel von cenpB in HaCaT-Keratinozyten.

Western Blot Analysen zeigen, dass weder die mit NIR, noch die mit 4 Gy oder der Kombination aus NIR und 4 Gy bestrahlte Probe zum untersuchten Zeitpunkt eine Veränderung der cenpB-Proteinmenge aufweist (S vs. NIR, S/4 Gy, NIR/4 Gy). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus 3 Versuchen, als Ladekontrolle wurde die Expression des Kontrollproteins GAPDH bestimmt.

#### 5.4. PathScan® Stress and Apoptosis Signaling

Mit Hilfe der PathScan®-Methode kann die Wirkung verschiedener Behandlungen auf viele verschiedene Proteine bzw. Proteinmodifikationen auf einmal untersucht werden (Abbildung 40). Auf eine mit verschiedenen Antikörpern beschichtete Glasplatte (Riegel) können bis zu sechzehn Proben aufgebracht und je nach PathScan® mit einer einzigen Probe bis zu 38 Proteine gleichzeitig untersucht werden.



**Abbildung 40:** Beispielbild eines PathScan® *Stress and Apoptosis Signaling Antibody Array*-Riegels.

In den Ecken des Arrays sind Chemilumineszenzkontrollen aufgetragen (P = positiv; N = negativ), über deren Aufnahme die einwandfreie Detektion des Arrays sichergestellt wird. Als Ladekontrolle dient bei diesem speziellen PathScan® das Haushaltsprotein αTubulin. Jedes der zu untersuchenden Proteine, einschließlich der Ladekontrolle, wird im Duplikat detektiert. Auf einem solchen Riegel können bis zu 16 Proben gleichzeitig untersucht werden. Rechts sind beispielhaft zwei Chemilumineszenz-Aufnahmen eines Versuches mit HT-29 Zellen abgebildet. Der obere Ausschnitt zeigt das Proteinprofil einer unbestrahlten, der untere, das einer mit UV bestrahlten Probe. Durch die UV-Bestrahlung wurden verschiedene stressassoziierte Proteinmodifikationen hochreguliert, besonders deutlich wird diese Regulation bei pHSP27, pp53 und pSAPK/JNK. Quelle: *modifiziert nach* Data Sheet Cell Signaling PathScan®-Assay #12856



Um einen möglichst großen Überblick zu bekommen, welche Stress- und Apoptose-assoziierten Proteine durch die Bestrahlung mit NIR bzw. der Kombination aus NIR und ionisierender Strahlung beeinflusst werden, wurde hier ein PathScan® *Stress and Apoptosis Signaling Antibody Array* durchgeführt.

Hierzu wurden Zellen mit nahem Infrarot A und 24 h später mit ionisierender Strahlung bestrahlt. Anschließend wurden die Proben nach 4 h bzw. 24 h geerntet. Diese Zeitpunkte wurden gewählt, um zum einen den Einfluss der kombinierten Bestrahlung zu einem Zeitpunkt zu untersuchen, zu dem die Zellen noch mit Reparaturvorgängen auf strahleninduzierte Schäden reagieren (4 h). Zum anderen sollte der Effekt der NIR-Vorbestrahlung zu einem späten Zeitpunkt untersucht werden, zu dem davon ausgegangen werden kann, dass in den zu stark geschädigten Zellen die Apoptose bereits induziert wurde (24 h). Mit diesen Proben wurden im Folgenden PathScan® *Stress and Apoptosis Signaling Antibody Arrays* von Cell Signaling durchgeführt. Zum Vergleich der einzelnen Proben wurden die bildanalytisch ermittelten Grauwerte der verschiedenen Proteine bzw. jeweils auf den Grauwert der zugehörigen Ladekontrolle  $\alpha$ Tubulin normiert.

#### Versuchsaufbau:

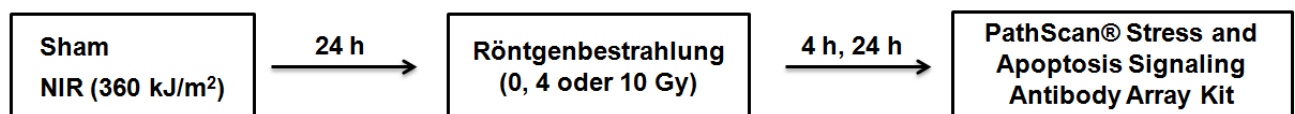


Tabelle 1 zeigt die Effekte der verschiedenen Strahlenarten bzw. der Kombination der beiden Strahlentypen auf NIH/3T3-Zellen 4 h nach der Röntgenbestrahlung, während Tabelle 2 die Effekte der verschiedenen Bestrahlungsmodalitäten 24 h nach der ionisierenden Bestrahlung zusammenfasst. Der Pfeil nach oben bedeutet hierbei, dass bei der bildanalytischen Auswertung des Arrays im Mittel eine mindestens 10%ige Erhöhung des Proteinlevels bzw. der untersuchten posttranslationalen Regulation im Vergleich zur jeweils erst genannten Probe detektiert wurde. Beispielsweise wird die phosphorylierte Form des Proteins Akt durch Röntgenbestrahlung mit 4 Gy im Vergleich zur Sham-Kontrolle mehr als 10% hochreguliert (Tabelle 1, pAkt *Ser473*, S vs. 4 Gy). Der Pfeil nach unten steht entsprechend für eine mehr als 10%ige Herunterregulation des jeweils untersuchten Proteins bzw. dessen posttranslationalen Regulation.

**Tabelle 1: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der PathScan® *Stress and Apoptosis*-Analyse von NIH/3T3-Fibroblasten 4 h nach der Bestrahlung mit 4 Gy.**

Dargestellt sind Effekte, die im Mittel größer als 10% sind. Gemittelt wurden die bildanalytisch gemessenen und auf das Kontrollprotein  $\alpha$ Tubulin normierten Grauwerte der einzelnen Proteine aus mehreren unabhängigen Versuchen (n=3, unpaired two-tailed students t-test CI=95%, - kein Effekt,  $\uparrow \geq 10\%$  Erhöhung,  $\downarrow \geq 10\%$  Senkung jeweils bezogen auf die erst genannte Probe).

S vs. NIR

-	$\uparrow$	$\downarrow$
pp44/42	pSmad2	pHSP27
pAkt	cCaspase-7	cCaspase-3
pBad	I $\kappa$ B $\alpha$	
pp53		
pp38 MAPK		
pSAPK/JNK		
cPARP		
pChk1		
pChk2		
pI $\kappa$ B $\alpha$		
peIF2 $\alpha$		
pTAK1		
Survivin		

S vs. 4 Gy

-	$\uparrow$	$\downarrow$
pp44/42	pAkt	pp38 MAPK
pChk2	pBad	cPARP
pI $\kappa$ B $\alpha$	pHSP27	
pTAK1	pSmad2	
Survivin	pp53	
	pSAPK/JNK	
	cCaspase-3	
	cCaspase-7	
	I $\kappa$ B $\alpha$	
	pChk1	
	peIF2 $\alpha$	

NIR vs. NIR/4 Gy

-	$\uparrow$	$\downarrow$
pp44/42	pAkt	pSmad2
pHSP27	pBad	cPARP
pp53	pSAPK/JNK	cCaspase-7
pp38 MAPK	cCaspase-3	I $\kappa$ B $\alpha$
pChk2	pChk1	pI $\kappa$ B $\alpha$
Survivin	peIF2 $\alpha$	
	pTAK1	

S/4 Gy vs. NIR/4 Gy

-	$\uparrow$	$\downarrow$
pp44/42	pTAK1	pHSP27
pAkt		pSmad2
pBad		cPARP
pp53		cCaspase-3
pp38 MAPK		cCaspase-7
pSAPK/JNK		I $\kappa$ B $\alpha$
pChk1		pChk2
		pI $\kappa$ B $\alpha$
		peIF2 $\alpha$
		Survivin

4 h nach der Bestrahlung mit 4 Gy Röntgen scheint es in den kombiniert bestrahlten Proben vermehrt zu einer Herunterregulation der Phosphorylierung der verschiedenen hier untersuchten Proteine zu kommen. Lediglich der Phosphorylierungsstatus von TAK1 wird im Mittel um mehr als 10% erhöht.

**Tabelle 2: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der PathScan® *Stress and Apoptosis*-Analyse von NIH/3T3-Fibroblasten 24 h nach der Bestrahlung mit 10 Gy.**

Dargestellt sind Effekte, die im Mittel größer als 10% sind. Gemittelt wurden die bildanalytisch gemessenen und auf das Kontrollprotein  $\alpha$ Tubulin normierten Grauwerte der einzelnen Proteine aus mehreren unabhängigen Versuchen (n=3, unpaired two-tailed students t-test CI=95%, \* P<0,05, \*\* P<0,01, - kein Effekt,  $\uparrow$   $\geq 10\%$  Erhöhung,  $\downarrow$   $\geq 10\%$  Senkung jeweils bezogen auf die erst genannte Probe).

**S vs. NIR**

-	$\uparrow$	$\downarrow$
pp44/42	cCaspase-7	pBad
pAkt		cPARP
pHSP27		I $\kappa$ B $\alpha$
pSmad2		pChk1
pp53		peIF2 $\alpha$
pp38 MAPK		
pSAPK/JNK		
cCaspase-3		
pChk2		
pI $\kappa$ B $\alpha$		
pTAK1		
Survivin		

**S vs. 10 Gy**

-	$\uparrow$	$\downarrow$
pp53	pTAK1	pp44/42
pp38 MAPK	Survivin	pAkt
cPARP		pBad
cCaspase-3		pHSP27
cCaspase-7		pSmad2
I $\kappa$ B $\alpha$		pSAPK/JNK
pChk2		pChk1
pI $\kappa$ B $\alpha$		peIF2 $\alpha$

**NIR vs. NIR/10 Gy**

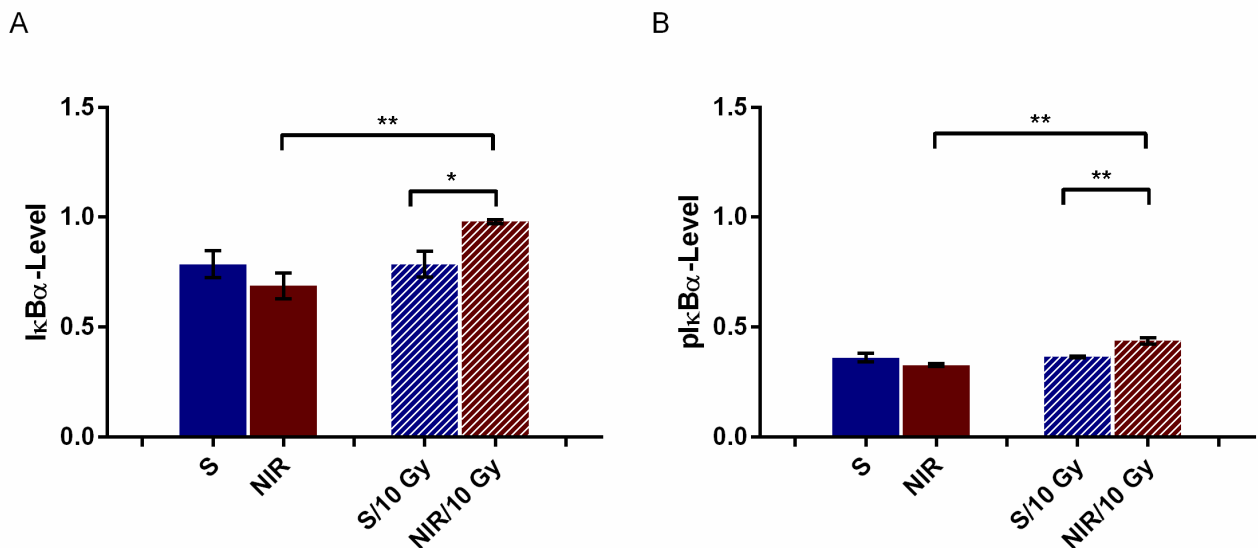
-	$\uparrow$	$\downarrow$
pAkt	pBad	pp44/42
pHSP27	pp53	pSmad2
pp38 MAPK	cPARP (*p=0,0246)	pSAPK/JNK
pChk2	cCaspase-3	cCaspase-7 (p=0,0605)
pTAK1	I $\kappa$ B $\alpha$ (* *p=0,0075)	pChk1
Survivin	pI $\kappa$ B $\alpha$ (**p=0,0026)	peIF2 $\alpha$

**S/10 Gy vs. NIR/10 Gy**

-	$\uparrow$	$\downarrow$
pp44/42	pBad	cCaspase-7
pAkt	pp53	peIF2 $\alpha$
pHSP27	cPARP	pTAK1
pSmad2	I $\kappa$ B $\alpha$ (*p=0,0319)	
pp38 MAPK	pI $\kappa$ B $\alpha$ (* *p=0,0084)	
pSAPK/JNK		
cCaspase-3		
pChk1		
pChk2		
Survivin		

24 h nach der Röntgenbestrahlung sticht besonders die Wirkung der kombinierten Bestrahlung auf das Protein I $\kappa$ B $\alpha$  hervor, welches ein wichtiges Regulatorprotein des NF $\kappa$ B-Signalweges ist. I $\kappa$ B $\alpha$  bindet den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B und verhindert dadurch dessen Translokation in den Zellkern. Wird I $\kappa$ B $\alpha$  an den Serinen 32/36 phosphoryliert, kommt es zum Abbau des Inhibitorproteins und NF $\kappa$ B kann in den Zellkern gelangen, wodurch es zur Aktivierung bestimmter Gene kommt [15].

Die Bestrahlung mit nahem Infrarot 24 h vor der Röntgenbestrahlung führt sowohl zu einem signifikanten Anstieg des gesamten I $\kappa$ B $\alpha$ -Levels als auch zu einem erhöhten Vorkommen der phosphorylierten Form dieses NF $\kappa$ B-Inhibitors (Abbildung 41, A, B, S/10 Gy vs. NIR/10 Gy). Um diesen Effekt der kombinierten Bestrahlung genauer darstellen zu können, wurde die bildanalytische Auswertung noch einmal als Balkendiagramm aufgetragen (Abbildung 41).



**Abbildung 41:** 24 h nach der Bestrahlung mit 10 Gy ist sowohl das I $\kappa$ B $\alpha$ - als auch das pI $\kappa$ B $\alpha$ -Level in den kombiniert bestrahlten NIH/3T3-Fibroblasten signifikant erhöht.

Durch die Bestrahlung mit NIR ist das Expressionslevel von I $\kappa$ B $\alpha$  48 h nach der Bestrahlung um durchschnittlich 12% gesenkt (A, S vs. NIR). Auch die phosphorylierte Form des Proteins ist leicht herab reguliert (B, S vs. NIR). Die Bestrahlung mit 10 Gy hat weder einen signifikanten Einfluss auf die Expression des Proteins noch auf die posttranslationale Modifikation (A, B, S vs. S/10 Gy). In den mit NIR und Röntgen bestrahlten Zellen hingegen zeigt sich sowohl bei I $\kappa$ B $\alpha$  als auch bei pI $\kappa$ B $\alpha$  eine signifikante Erhöhung (A, B, S/10 Gy vs. NIR/10 Gy). Die Werte repräsentieren den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen (n=3 +/-Standardfehler, unpaired two-tailed students t-test CI=95%, \* P<0,05, \*\* P<0,01).

## 5.5. Einfluss von NIR und Röntgenstrahlung auf den Metabolismus von Zellen

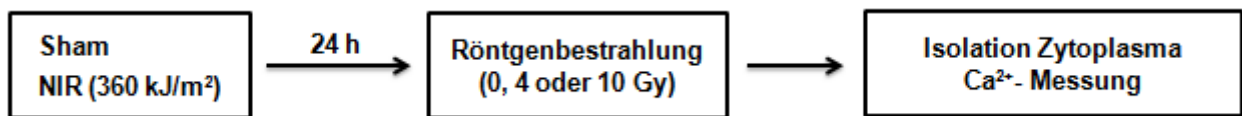
### 5.5.1. Untersuchung des zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Gehalts nach der kombinierten Bestrahlung

Für die Bestrahlung mit nahem Infrarot der Wellenlänge 632,8 nm wurde gezeigt, dass diese zu einem oszillierenden Anstieg des zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Spiegels in Hepatozyten von Ratten führt [45]. Auch nach ionisierender Strahlung wird diesem sekundären Botenstoff eine wichtige Rolle bei der Regulation verschiedener schadensinduzierter Prozesse, wie beispielsweise dem Eintreten eines Zellzyklusarrests, der DNA-Reparatur sowie der Apoptose, zugeschrieben [202-204]. Sowohl nach NIR als auch nach Röntgenbestrahlung wurde somit eine Modulation des Calciumgehalts in bestrahlten Zellen gezeigt, weshalb im Folgenden untersucht werden sollte, ob auch die kombinierte Bestrahlung Einfluss auf diesen zellulären Parameter hat.

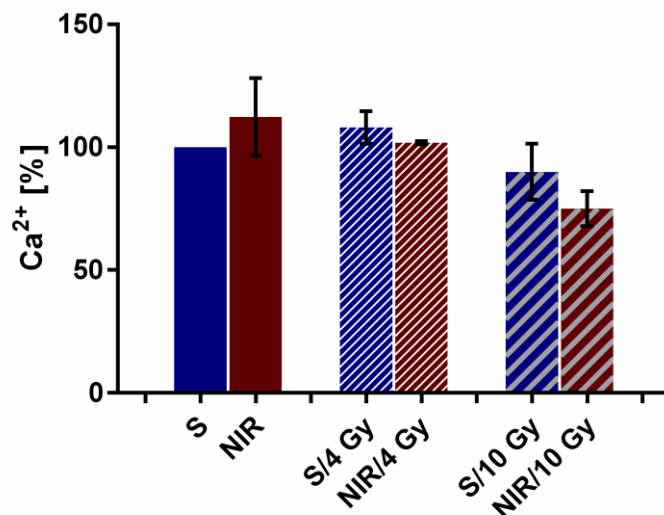
---

Da vor allem die Veränderung der zytosolischen Calciumkonzentration eine Rolle bei der Antwort auf die beiden Strahlenarten spielt, wurden NIH/3T3-Fibroblasten mit NIR, 4 Gy, 10 Gy oder mit der Kombination aus diesen beiden Strahlenarten bestrahlt (NIR/Röntgen) und das Zytoplasma der Zellen direkt nach der ionisierenden Bestrahlung isoliert. Um den direkten Einfluss der verschiedenen Bestrahlungsmodalitäten auf diesen Zellparameter untersuchen zu können, blieb bei jedem Versuch eine Probe unbestrahlt (S). Der Calciumgehalt der Proben wurde mittels *Calcium Colorimetric Assay Kit* von *BioVision* bestimmt.

**Versuchsaufbau:**



Die Bestrahlung mit NIR hat nach 24 h eine tendenzielle Erhöhung des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts in NIH/3T3-Fibroblasten zur Folge (Abbildung 42, S vs. NIR). Die Bestrahlung mit 4 Gy erhöht direkt nach der Bestrahlung ebenfalls minimal das Level an zytosolischem Calcium, während die Bestrahlung mit 10 Gy zu einem leichten Absinken des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels führt (Abbildung 42, S vs. 4 Gy, S vs. 10 Gy). Die kombinierte Bestrahlung mit NIR und 4 Gy zeigt, verglichen mit der Sham-Kontrolle (Abbildung 42, S vs. NIR/4 Gy), kaum Veränderungen des Calciumgehalts. Die kombinierte Bestrahlung mit NIR und 10 Gy hingegen führt zu einem noch niedrigeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Level als die ausschließliche Bestrahlung mit 10 Gy (Abbildung 42, S/10 Gy vs. NIR/10 Gy).



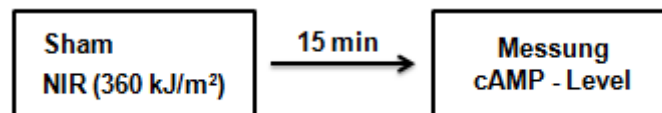
**Abbildung 42:** NIR erhöht tendenziell das Ca<sup>2+</sup>-Level im Zytosol von NIH/3T3-Fibroblasten, in den kombiniert bestrahlten Zellen ist dieses jedoch jeweils niedriger als in den ausschließlich mit Röntgen bestrahlten Zellen.

24 h nach der Bestrahlung mit nahem Infrarot A zeigt sich ein erhöhender Trend durch diese Strahlenart (S vs. NIR). 4 Gy führen ebenfalls zu einer minimalen Erhöhung des Ca<sup>2+</sup>-Gehalts im Zytoplasma der bestrahlten Zellen (S vs. S/4 Gy), wohingegen 10 Gy zu einer Verminderung des Calciumspiegels führen (S vs. S/10 Gy). Der durch die Bestrahlung mit 4 Gy Röntgen induzierte leichte Ca<sup>2+</sup>-Anstieg bleibt in den kombiniert bestrahlten Proben aus (S/4 Gy vs. NIR/4 Gy). Die mit NIR und 10 Gy bestrahlten Zellen hingegen weisen im Vergleich zu den ausschließlich mit dieser Röntgendosis bestrahlten Zellen einen verstärkten Abfall des Calciumgehalts auf (S/10 Gy vs. NIR/10 Gy). Die Werte repräsentieren den auf die jeweilige Sham-Kontrolle normierten Mittelwert des zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Signales aus mehreren unabhängigen Versuchen (n=3 +/- Standardfehler, unpaired two-tailed students t-test CI=95%).

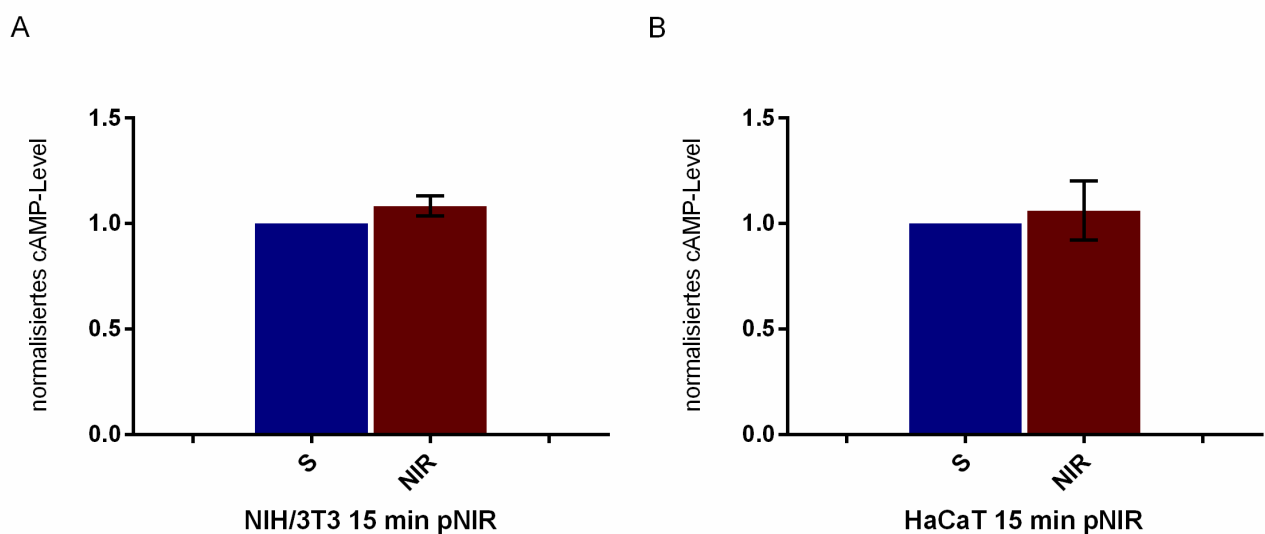
### 5.5.2. cAMP-Spiegel nach NIR und der Kombination von NIR mit Röntgenstrahlung

Ein weiteres wichtiges sekundäres Botenstoffmolekül, das bei der Signaltransduktion sowie bei der Aktivierung verschiedener Proteinkaskaden eine Rolle spielt, ist das *cyclische Adenosinmonophosphat* (cAMP). Über die monochromatischen Wellenlängen 404, 632,8 und 760 nm des nahen Infrarot A-Spektrums ist bekannt, dass sie die intrazelluläre Konzentration dieses Botenstoffes verändern [43], weshalb untersucht werden sollte, ob solche Veränderungen auch bei der Bestrahlung mit dem hier verwendeten breiten NIR-Wellenlängenspektrum auftreten. Hierfür wurden sowohl NIH/3T3 als auch HaCaT-Zellen mit NIR bestrahlt und 15 min nach der Bestrahlung geerntet. Mit Hilfe des *Cyclic AMP XP® Assay Kits* von Cell Signaling Technology wurde dann das cAMP-Level bestimmt.

## Versuchsaufbau:



Die Bestrahlung mit NIR hat weder in NIH/3T3 noch in HaCaT-Zellen einen signifikanten Einfluss auf das intrazelluläre cAMP-Level, jedoch zeigt sich in beiden Zelltypen eine tendenzielle Erhöhung durch die Bestrahlung (Abbildung 43, A, B, S vs. NIR).



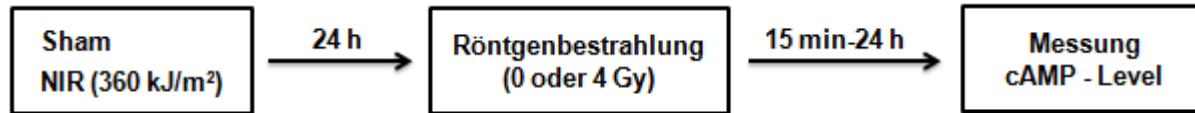
**Abbildung 43: NIR hat in den ersten 15 min nach der Bestrahlung keinen signifikanten Einfluss auf das cAMP-Level von NIH/3T3 und HaCaT-Zellen.**

Sowohl in den NIH/3T3 (A) als auch in den HaCaTs (B) zeigt sich tendenziell eine Steigerung des cAMP-Levels durch die Bestrahlung mit NIR (S vs. NIR). Die Werte repräsentieren den auf die jeweilige Sham-Kontrolle normierten Mittelwert mehrerer unabhängiger Versuche ( $n=6$  +/- Standardfehler, unpaired two-tailed students t-test CI=95%).

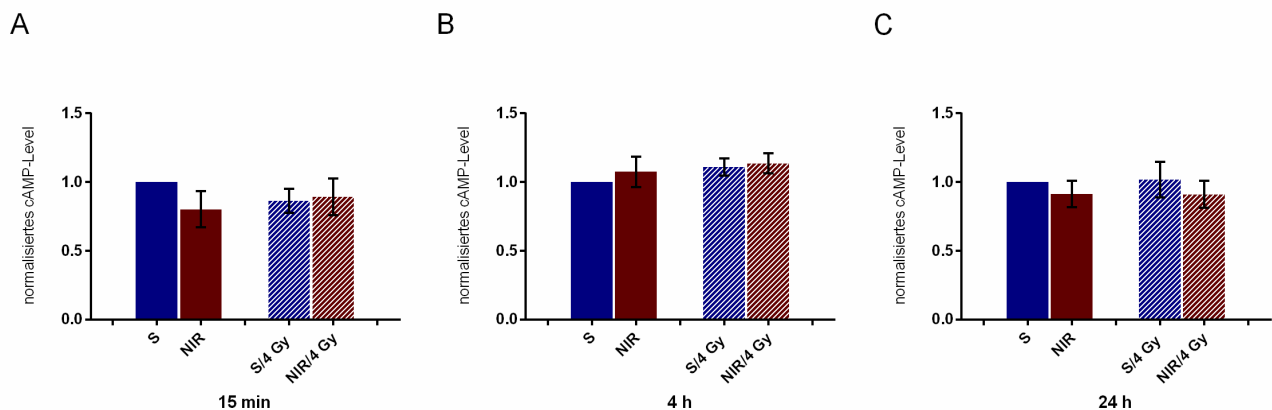
Nachdem sich gezeigt hat, dass die Bestrahlung mit nahem Infrarot zu einem sehr frühen Zeitpunkt (15 min nach NIR) noch keinen starken Einfluss auf die cAMP-Konzentration der bestrahlten Zellen hat, sollte des Weiteren geklärt werden, ob die nahe Infrarotstrahlung zu einem späteren Zeitpunkt einen Effekt auf diesen zellulären Parameter hat und ob die Kombination aus NIR und Röntgen das Level dieses sekundären Botenstoffes beeinflusst. Für diese Untersuchung wurden sowohl NIH/3T3 als auch HaCaTs mit NIR bestrahlt und für 24 h unter normalen Kulturbedingungen weiter kultiviert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen mit 4 Gy bestrahlt und dann 15 min, 4 h und 24 h nach

dieser Bestrahlung geerntet. Auch hier wurde mittels *Cyclic AMP XP® Assay Kit* von Cell Signaling Technology das cAMP-Level der Proben bestimmt.

#### Versuchsaufbau:



24 h nach der Bestrahlung mit NIR weisen NIH/3T3-Fibroblasten im Mittel ein um 20% niedrigeres cAMP-Level auf, auch die Bestrahlung mit 4 Gy sowie die kombinierte Bestrahlung führen 15 min nach der Röntgenbestrahlung zu einer mehr als zehnprozentigen Senkung (Abbildung 44, A, S vs. NIR, S/4 Gy, NIR/4 Gy). Weitere 4 h später ist das cAMP-Level in den Fibroblasten unabhängig von der Bestrahlungsart höher als in den Sham-Kontrollen (Abbildung 44, B, S vs. NIR, S/4 Gy, NIR/4 Gy). Die Messung dieses sekundären Botenstoffes 24 h nach der Bestrahlung mit ionisierender Strahlung zeigt in den mit NIR bestrahlten Zellen eine leichte Senkung um 9% (Abbildung 44, C, S vs. NIR), die sich auch in den mit NIR/4 Gy bestrahlten Zellen nachweisen lässt (Abbildung 44, C, S vs. NIR/4 Gy). In den ausschließlich mit 4 Gy bestrahlten NIH/3T3 entspricht der cAMP-Spiegel in etwa dem der Kontrolle (Abbildung 44, C, S vs. S/4 Gy).

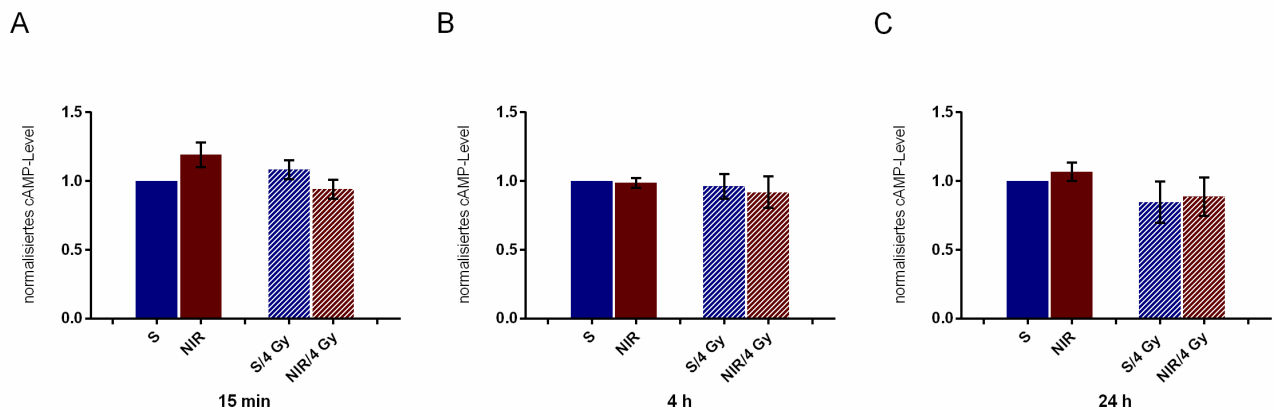


**Abbildung 44: Die Vorbestrahlung mit NIR führt in NIH/3T3 zu einer oszillierenden Veränderung der intrazellulären cAMP-Konzentration.**

24 h nach der Bestrahlung mit NIR ist der cAMP-Spiegel in NIH/3T3-Zellen um 20% gesenkt (A, S vs. NIR). Auch die mit 4 Gy und der Kombination aus NIR und ionisierender Strahlung bestrahlten Zellen weisen ein leichtes Absinken des cAMP-Spiegels auf (A, S vs. S/4 Gy, NIR/4 Gy). 4 h nach der Bestrahlung mit Röntgen ist das cAMP-Level sowohl in den mit NIR, 4 Gy als auch in den kombiniert bestrahlten Zellen höher als in denen der Sham-Kontrollen (B, S vs. NIR, S/4 Gy, NIR/4 Gy). Die cAMP-Messung 48 h nach der Bestrahlung mit NIR zeigt, dass das cAMP-Level zu diesem Zeitpunkt durch nahes Infrarot erneut gesenkt ist (C, S vs. NIR). Die mit 4 Gy bestrahlten Zellen haben 24 h nach der Röntgenbestrahlung nahezu das Kontrollniveau wieder erreicht (C, S vs. S/4 Gy). Die mit NIR und Röntgen bestrahlten NIH/3T3 weisen hingegen ein ähnliches cAMP-Level auf, wie die ausschließlich mit NIR bestrahlte Zellen (C, NIR vs. NIR/4 Gy). Die Werte repräsentieren den auf die jeweilige Sham-Kontrolle normierten Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen ( $n=6$  +/- Standardfehler, unpaired two-tailed students t-test CI=95%).



Die Bestrahlung mit NIR führt in HaCaT-Zellen zu einer anderen Entwicklung des zellulären cAMP-Spiegels als in NIH/3T3-Fibroblasten. 24 h nach der NIR-Bestrahlung weisen HaCaT-Zellen einen um durchschnittlich 20% erhöhten cAMP-Spiegel auf (Abbildung 45, A, S vs. NIR), auch die Bestrahlung mit 4 Gy erhöht diesen minimal (Abbildung 45, A, S vs. S/4 Gy). In den mit NIR und Röntgen bestrahlten Zellen hingegen bleibt das cAMP-Level in etwa auf dem Kontrollniveau (Abbildung 45, A, S vs. NIR/4 Gy). 4 h nach der ionisierenden Bestrahlung zeigt sich nur in den doppeltbestrahlten Zellen ein nennenswerter Unterschied von 8% weniger cAMP im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 45, B, S vs. NIR/4 Gy). Ebenso ist der Unterschied zwischen S und NIR, sowie zwischen S und 4 Gy 24 h nach der Röntgenbestrahlung sehr gering, nur die mit NIR und Röntgen bestrahlten Zellen weisen nach wie vor ein um 11% niedrigeres Level auf (Abbildung 45, C, S vs. NIR/4 Gy).



**Abbildung 45: Die kombinierte Bestrahlung bewirkt in HaCaT-Keratinocyten zu jedem untersuchten Zeitpunkt eine Senkung des cAMP-Levels.**

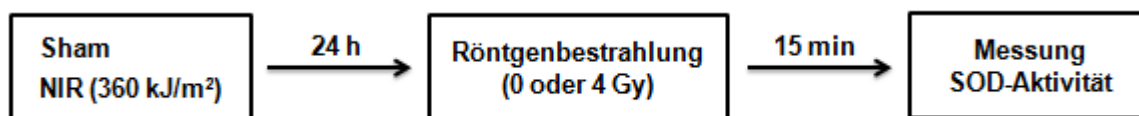
Die Bestrahlung mit nahem Infrarot A erhöht das cAMP-Level in den ersten 24 h nach der Bestrahlung um fast 20% (A, S vs. NIR). 4 Gy Röntgen haben 15 min nach der Bestrahlung ebenfalls eine leicht cAMP-fördernde Wirkung (A, S vs. S/4 Gy). Die kombinierte Bestrahlung hingegen senkt das cAMP-Level tendenziell um 6% (A, S vs. NIR/4 Gy). 4 h nach der ionisierenden Bestrahlung zeigen weder NIR noch 4 Gy einen besonderen Einfluss auf das cAMP-Level der bestrahlten Zellen, die Kombination aus den beiden Strahlenarten führt ebenfalls nur zu einer leichten Senkung um 8% (B, S vs. NIR/4 Gy). Nach 24 h zeigen sich ebenfalls nur geringe Tendenzen durch die verschiedenen Bestrahlungen, die Bestrahlung mit NIR erhöht das cAMP-Level durchschnittlich um 7% (C, S vs. NIR). Die Bestrahlung mit 4 Gy senkt es um 8% (C, S vs. S/4 Gy). Durch die kombinierte Bestrahlung wird der cAMP-Spiegel um 11% gesenkt (C, S vs. NIR/4 Gy). Die Werte repräsentieren den auf die jeweilige Sham-Kontrolle normierten Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen (n=6 +/- Standardfehler, unpaired two-tailed students t-test CI=95%).

### 5.5.3. Messung der *Superoxid Dismutase*-Aktivität nach der kombinierten Bestrahlung mit NIR und Röntgenstrahlung

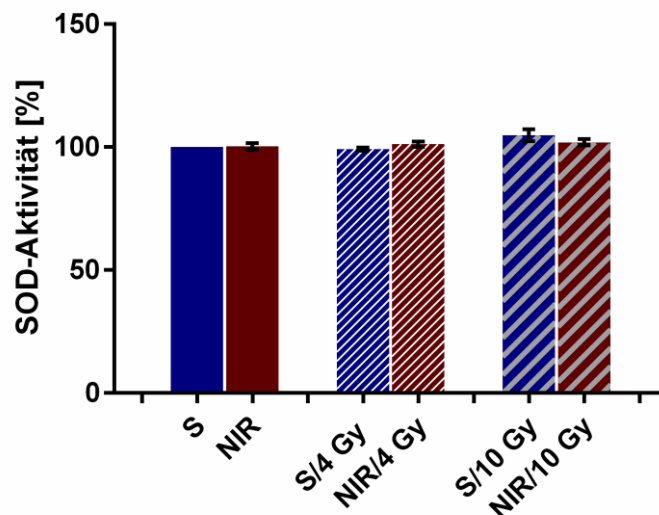
Sowohl NIR als auch die Bestrahlung mit ionisierender Strahlung führen zur Induktion *Reaktiver Sauerstoffspezies* (ROS) [11, 42, 205]. Es konnte auch gezeigt werden, dass in Zellen, die mit der Kombination aus NIR und Röntgen bestrahlt wurden, mehr ROS induziert werden, als das nach der reinen Röntgenbestrahlung der Fall ist [11].

Die SOD (*Superoxid Dismutase*) ist ein Protein, das dem antioxidativen System der Zelle zugeordnet wird [186]. Die Proteine dieses Systems haben die Aufgabe, endogene, aber auch durch mögliche exogene Reize zusätzlich entstandene ROS abzubauen und die Zellen so vor oxidativem Stress zu schützen. Mit Hilfe des *Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit* von BioVision kann die Aktivität dieses Proteins bestimmt werden. Für die Untersuchung der SOD-Aktivität wurden Messungen an röntgenbestrahlten NIH/3T3-Zellen sowohl mit als auch ohne NIR-Vorbehandlung durchgeführt.

#### Versuchsaufbau:



Bei der Messung der SOD-Aktivität zeigte sich, dass 15 min nach der Bestrahlung mit ionisierender Strahlung keine der durchgeführten Behandlungen einen Einfluss auf die Aktivität dieses antioxidativen Enzyms hat (Abbildung 46).



**Abbildung 46:** Keine der verwendeten Bestrahlungsmodalitäten hat einen Einfluss auf die Aktivität der *Superoxid Dismutase*.

Die Bestrahlung mit nahem Infrarot zeigt 24 h nach der Bestrahlung eine unveränderte SOD-Aktivität in NIH/3T3-Zellen, auch die mit 4 Gy und 10 Gy sowie die kombiniert bestrahlten Zellen zeigen 15 min nach der Röntgenbestrahlung eine nahezu gleichbleibende Aktivität wie die Zellen der Sham-Kontrolle. Die Werte repräsentieren den auf die jeweilige Sham-Kontrolle normierten Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen (n=3 +/- Standardfehler, unpaired two-tailed students t-test CI=95%).

## 5.6. wIRA und NIR im Vergleich

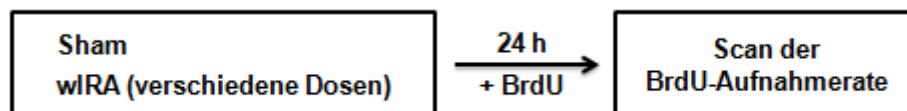
Die Bestrahlung mit wassergefiltertem Infrarot A findet in der Medizin in verschiedenen Bereichen Anwendung. So wird diese Art der Bestrahlung z.B. zur Verbesserung der Wundheilung, zur Linderung von Schmerzen und zur Unterstützung der Bestrahlungstherapie im Rahmen der Behandlung von Brustkrebs eingesetzt [1, 3-5]. Für die Anwendung im klinischen Alltag gibt es spezielle Halogenstrahler (Hydrosun® 750), deren Spektrum durch den Einsatz von Farb- sowie Wasserfiltern auf den Wellenlängenbereich des nahen Infrarot As limitiert werden kann. Der Unterschied zwischen diesen medizinisch genutzten Strahlern und dem hier verwendeten experimentellen Aufbau liegt vor allem in der Leistung (W) der eingesetzten Lampen. Während die Lampen des experimentellen Aufbaus 250 W haben, hat die Halogenlampe des medizinischen Strahlers 750 W. Dieser Unterschied führt dazu, dass mit dem medizinischen Strahler eine bestimmte Infrarot A-Dosis in sehr viel kürzerer Zeit appliziert wird, als mit der laboreigenen Apparatur. 360 kJ/m<sup>2</sup> werden beispielsweise bei Verwendung der laboreigenen Apparatur bei einem Leistungsfluss von 18 mW/cm<sup>2</sup> über 35 min Bestrahlungsdauer appliziert. Um dieselbe Infrarot-Dosis mit dem Hydrosun®-Strahler zu erreichen, müssen die Proben bei einem Leistungsfluss von 200 mW/cm<sup>2</sup> nur 3 min bestrahlt werden. Dies hat zur Folge, dass eine bestimmte Energiedosis in sehr viel kürzerer Zeit im Gewebe deponiert wird, woraus sich die Frage ergab, ob diese zeitliche Differenz möglicherweise zu einer veränderten

zellulären Antwort auf dieselbe Energiedosis des selben Wellenlängenbereichs führt. Als Parameter für den Vergleich der beiden Strahlenquellen wurden die Proliferationsrate und die Entstehung *Reaktiver Sauerstoffspezies* (ROS) nach der reinen Infrarot-Bestrahlung sowie nach der kombinierten Bestrahlung gewählt.

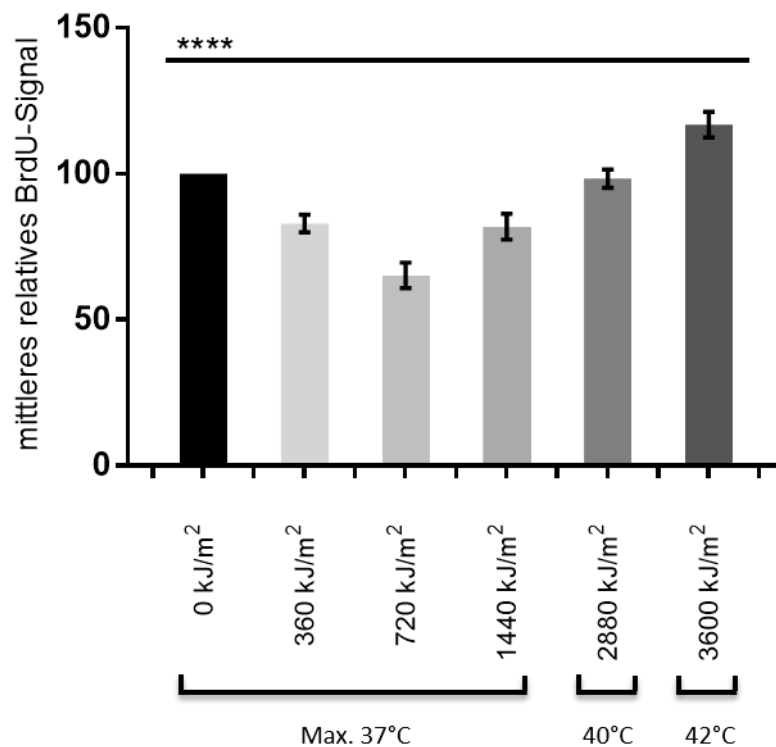
#### 5.6.1. BrdU-Aufnahmerate nach wIRA und wIRA kombiniert mit ionisierender Strahlung

NIH/3T3-Zellen wurden mit dem Hydrosun® 750-Strahler mit verschiedenen Infrarot A-Dosen (wassergefiltertes Infrarot A, wIRA) bestrahlt und anschließend unter normalen Kulturbedingungen für 24 h unter Zugabe des Thymidinanalogons BrdU weiter kultiviert. Während der gesamten Bestrahlungsdauer wurde die Temperaturentwicklung im Medium der bestrahlten Zellen kontrolliert. Als Kontrolle blieb jeweils eine Probe pro Dosis unbestrahlt. Der BrdU-Einbau und somit die Proliferationsrate wurde immunhistochemisch nachgewiesen.

##### Versuchsaufbau:



Die niedrigste wIRA-Dosis von  $360 \text{ kJ/m}^2$  senkt die BrdU-Aufnahmerate im Vergleich zur Sham-Kontrolle um 17% (Abbildung 47, S vs.  $360 \text{ kJ/m}^2$ ). Durch die Verdopplung dieser Dosis wird die BrdU-Aufnahmerate sogar um mehr als ein Drittel gesenkt (Abbildung 47, S vs.  $720 \text{ kJ/m}^2$ ). Verglichen mit der Sham-Kontrolle kommt es durch eine wIRA-Bestrahlung mit  $1440 \text{ kJ/m}^2$  nach wie vor zu einer verringerten Aufnahme des Thymidinanalogons (Abbildung 47, S vs.  $1440 \text{ kJ/m}^2$ ). Im Vergleich zur vorangegangenen Dosis von  $720 \text{ kJ/m}^2$  steigt die Aufnahmerate jedoch wieder an (Abbildung 47,  $720 \text{ kJ/m}^2$  vs.  $1440 \text{ kJ/m}^2$ ). Nach einer Bestrahlung mit  $2880 \text{ kJ/m}^2$  erreicht die BrdU-Aufnahmerate sogar nahezu das Kontrolllevel, hier steigt jedoch die Temperatur erstmalig über das physiologische Maß an. Im Medium der Proben wird zum Ende der Bestrahlung im Durchschnitt eine Temperatur von  $40^\circ\text{C}$  gemessen. Das Maximum des BrdU-Einbaus mit 17% Erhöhung gegenüber der Sham-Kontrolle ist bei der Bestrahlung mit  $3600 \text{ kJ/m}^2$  erreicht (Abbildung 47, S vs.  $3600 \text{ kJ/m}^2$ ). Bei dieser Bestrahlungsdosis wurde durchschnittlich eine Temperatur von  $42^\circ\text{C}$  im Medium gemessen.



**Abbildung 47: Die Bestrahlung mit wIRA führt dosisabhängig zu einer biphasischen Veränderung der BrdU-Aufnahmerate.** NIH/3T3-Zellen, die mit 360 kJ/m<sup>2</sup> wIRA bestrahlt wurden, zeigen verglichen mit der Sham eine um 17% gesenkte BrdU-Aufnahmerate (S vs. 360 kJ/m<sup>2</sup>). Die Bestrahlung mit 720 kJ/m<sup>2</sup> senkt diese sogar um 35%. Wird die wIRA-Dosis jedoch verdoppelt, steigt die BrdU-Aufnahmerate stetig wieder an. 1440 kJ/m<sup>2</sup> wIRA senken die Proliferationsrate nur noch um 18% (S vs. 1440 kJ/m<sup>2</sup>), nach einer Bestrahlung mit 2880 kJ/m<sup>2</sup> (40°C) ist sogar das Niveau der Kontrolle wieder erreicht (S vs. 2880 kJ/m<sup>2</sup>). Die Bestrahlung mit 3600 kJ/m<sup>2</sup> (42°C) induziert im Vergleich zur Sham-Kontrolle einen Anstieg der BrdU-Aufnahmerate um 17% (S vs. 3600 kJ/m<sup>2</sup>). Alle Veränderungen der BrdU-Aufnahmerate sind verglichen mit der jeweiligen Sham hoch signifikant. Die Werte repräsentieren den normierten Mittelwert des BrdU-Signales aus mehreren einzeln gemessenen Zellkernen aus drei unabhängigen Versuchen. (0 kJ/m<sup>2</sup> – 1440 kJ/m<sup>2</sup> n=3000, 2880 kJ/m<sup>2</sup> – 3600 kJ/m<sup>2</sup> n=2000, +/- Standardabweichung, unpaired two-tailed students t-test CI=95%, \*\*\*\* P<0,0001).

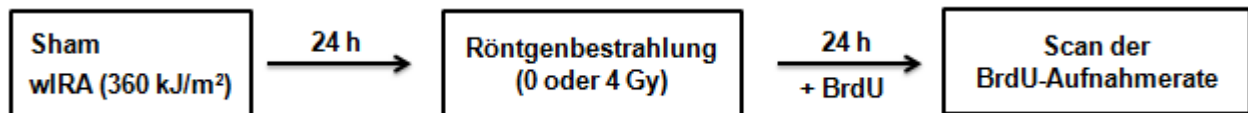
360 kJ/m<sup>2</sup> NIR mit der laboreigenen Apparatur appliziert, haben eine verringerte BrdU-Aufnahmerate zur Folge [199]. Mit Hilfe der hier durchgeführten Versuche konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt unabhängig von der Zeit ist, innerhalb derer die Zellen mit dieser Dosis bestrahlt werden (Abbildung 47, S vs. 360 kJ/m<sup>2</sup>, wIRA).

Kombiniert man NIR mit ionisierender Strahlung kommt es zu einer geringeren röntgeninduzierten Reduktion der Proliferation [199], d.h. NIR verringert die Inhibition der Proliferation, die die durch Röntgenbestrahlung verursachten Schäden normalerweise hervorruft. Zum Vergleich der beiden Bestrahlungseinheiten sollte im Folgenden untersucht werden, ob auch die Bestrahlung mit 360 kJ/m<sup>2</sup> mit dem Hydrosun®-Strahler (wIRA) diesen Einfluss auf die röntgeninduzierte Hemmung der Proliferation hat. Hierfür wurden Zellen mit 360 kJ/m<sup>2</sup> wIRA und 24 h später mit 4 Gy bestrahlt

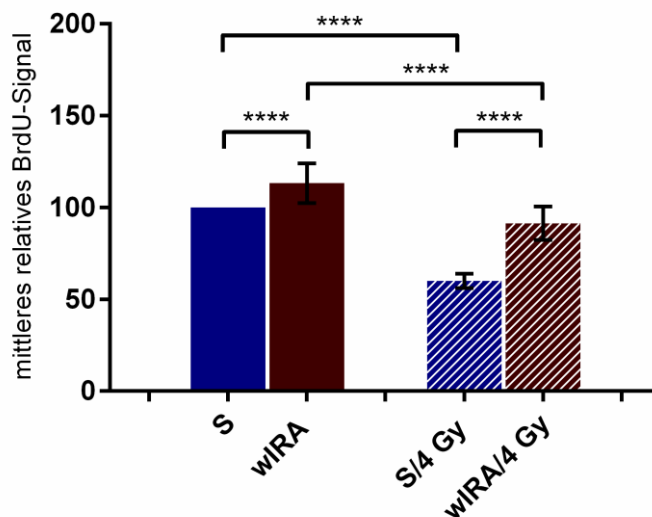
---

(wIRA/4 Gy). Nach der Röntgenbestrahlung wurden die Zellen 24 h unter normalen Kulturbedingungen unter BrdU-Zugabe inkubiert. Der Einbau des Thymidinanalogons wurde immunhistochemisch nachgewiesen. Als Kontrollen dienten jeweils eine Probe, die komplett unbestrahlt blieb (S), eine Probe, die ausschließlich mit wIRA bestrahlt wurde (wIRA) und eine Probe, die nur mit 4 Gy bestrahlt wurde (S/4 Gy).

**Versuchsaufbau:**



Im Zuge dieses Versuchsaufbaus konnte gezeigt werden, dass wIRA 48 h nach der Bestrahlung keinen proliferationssenkenden Einfluss mehr hat, sondern im Gegenteil die Bestrahlung mit 360 kJ/m<sup>2</sup> wIRA im untersuchten Zeitraum eine um 13% gesteigerte BrdU-Aufnahme zur Folge hat (Abbildung 48, S vs. wIRA). Wie erwartet, reduziert die Bestrahlung mit 4 Gy die Aufnahme von BrdU (Abbildung 48, S vs. 4 Gy). Bemerkenswerterweise hat die kombinierte Bestrahlung aus wIRA und Röntgen denselben Effekt wie die Kombination aus NIR und ionisierender Strahlung. Vergleicht man die ausschließlich mit 4 Gy bestrahlten Zellen mit denen, die mit wIRA und 4 Gy bestrahlt wurden, zeigt sich eine Differenz von 31% (Abbildung 48, 4 Gy vs. wIRA/4 Gy). Die Bestrahlung mit wIRA und Röntgen reduziert die Aufnahme von BrdU nur um 9% verglichen mit der Sham (Abbildung 48, S vs. wIRA/4 Gy), während 4 Gy die BrdU-Aufnahmerate fast halbieren (Abbildung 48, S vs. 4 Gy).



**Abbildung 48:** Die Bestrahlung mit  $360 \text{ kJ/m}^2$  wIRA wirkt der durch Röntgenbestrahlung verursachten Proliferationshemmung entgegen.

wIRA alleine hat im Zeitraum 24-48 h nach der Bestrahlung eine erhöhte Aufnahme des Thymidinanalogs BrdU zur Folge (S vs. wIRA). Die Bestrahlung mit 4 Gy reduziert die BrdU-Aufnahmerate um 40% (S vs. 4 Gy). Die kombiniert bestrahlten Zellen weisen jedoch gerade mal eine Reduktion um 9% auf (S vs. wIRA/4 Gy). Die Werte repräsentieren den normierten Mittelwert des BrdU-Signales aus mehreren einzeln gemessenen Zellkernen aus zwei unabhängigen Versuchen. (n=2000, +/- Standardabweichung, unpaired two-tailed students t-test CI=95%, \*\*\*\* P<0,0001).

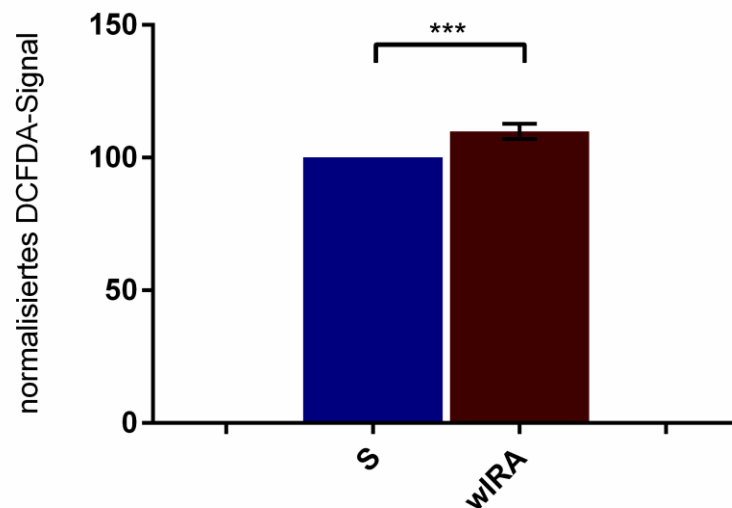
### 5.6.2. ROS-Induktion nach wIRA und wIRA in Kombination mit Röntgenstrahlung

Als weiterer Untersuchungsparameter für den Vergleich zwischen den beiden Bestrahlungsapparaten wurde die Induktion *Reaktiver Sauerstoffspezies* (ROS) gewählt.  $360 \text{ kJ/m}^2$  appliziert mit der laboreigenen Bestrahlungsapparatur verursachen einen Anstieg der endogenen ROS in retinalen Vorläuferzellen (R28) aus der Ratte [34]. Für die vergleichende Untersuchung wurden HaCaT-Zellen mit  $360 \text{ kJ/m}^2$  wIRA (Hydrosun®-Strahler) bestrahlt. Der Nachweis *Reaktiver Sauerstoffspezies* wurde mit Hilfe einer DCFDA-Fluoreszenzmessung im ELISA-Reader durchgeführt.

#### Versuchsaufbau:



Die Bestrahlung mit wIRA führt direkt im Anschluss an die Bestrahlung zu einem signifikanten Anstieg endogener ROS um 10% (Abbildung 49, S vs. wIRA).

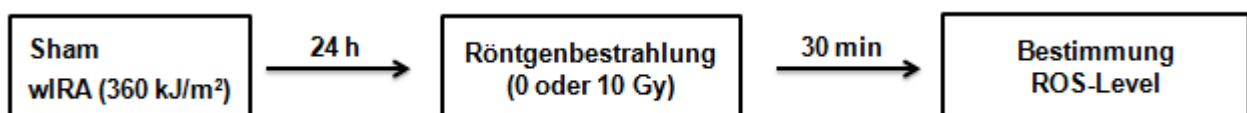


**Abbildung 49: 360 kJ/m<sup>2</sup> wIRA verursachen einen signifikanten Anstieg des endogenen ROS-Levels.**

Mittels DCFDA-Fluoreszenzmessung im ELISA-Reader zeigt sich, dass HaCaT-Zellen, die mit 360 kJ/m<sup>2</sup> wIRA bestrahlt wurden, direkt nach der Bestrahlung eine signifikante Erhöhung der endogenen *Reaktiven Sauerstoffspezies* aufweisen. Die Werte stellen den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen normiert auf die jeweilige Sham-Kontrolle dar (n=4, +/- Standardfehler, unpaired two-tailed students t-test CI=95%, \*\*\* P<0,001).

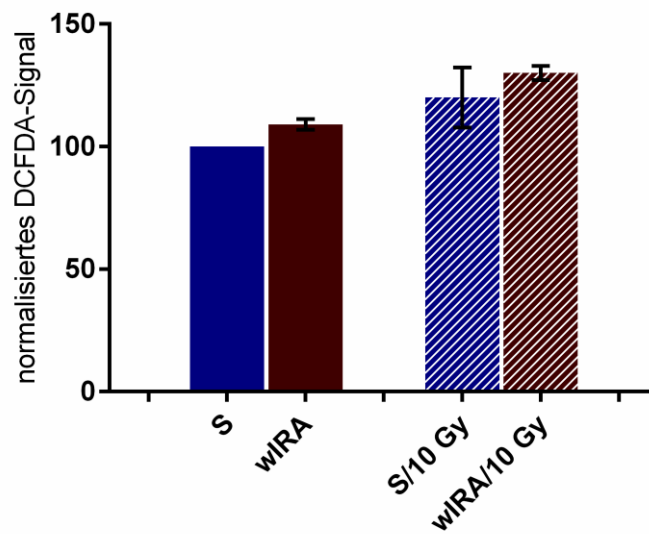
In Folge einer Bestrahlung mit ionisierender Strahlung entstehen ebenfalls vermehrt *Reaktive Sauerstoffspezies*, welche die Hauptursache für sekundäre Strahlenschäden sind. Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass die Induktion von ROS durch die Kombination aus NIR und Röntgen sogar noch höher ist, als nach einer exklusiven Röntgenbestrahlung [11]. Zur Untersuchung des wIRA-Einflusses auf die röntgeninduzierte Entstehung *Reaktiver Sauerstoffspezies* wurden HaCaT-Keratinocyten mit 360 kJ/m<sup>2</sup> wIRA und 24 h später mit 10 Gy bestrahlt. Mittels ELISA-Reader wurde anschließend das endogene ROS-Level über DCFDA-Fluoreszenz bestimmt.

#### Versuchsaufbau:



Die DCFDA-Messung der ausschließlich mit wIRA bestrahlten HaCaT-Zellen zeigt auch 24 h nach der Bestrahlung noch eine signifikante Erhöhung des ROS-Levels um 9% (Abbildung 50, S vs. wIRA). Die Bestrahlung mit 10 Gy führt zu einem ROS-Anstieg von 20% (Abbildung 50, S vs. S/10 Gy), die kombinierte Bestrahlung erhöht das Level endogener *Reaktiver Sauerstoffspezies* sogar um 30% (Abbildung 50, S vs. wIRA/10 Gy).





**Abbildung 50:** Die Vorbestrahlung mit wIRA führt in HaCaTs zu einem erhöhten Anstieg *Reaktiver Sauerstoffspezies* nach ionisierender Strahlung.

Auch 24 h nach der Bestrahlung mit wIRA weisen die bestrahlten Zellen, verglichen mit der unbestrahlten Sham-Kontrolle, ein um 10% erhöhtes ROS-Level auf (S vs. wIRA). Durch die Bestrahlung mit 10 Gy wird ein Anstieg der *Reaktiven Sauerstoffspezies* um 20% induziert (S vs. 10 Gy). Nach der Bestrahlung mit wIRA und ionisierender Strahlung zeigt sich ein additiver Effekt der beiden Strahlenarten auf die Induktion *Reaktiver Sauerstoffspezies*. Die Werte stellen den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen normiert auf die jeweilige Sham-Kontrolle dar (n=2, +/- Standardabweichung).

## 6. Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

**Tabelle 3: Etablierung eines humanen Vollhautmodells für strahlenbiologische Fragestellungen**

↑Anstieg, ↓Abfall, \*\*\* P<0,001, \*\*\*\* P<0,0001, unpaired two-tailed students t-test CI=95%

Endpunkt	Methode/Ziel		Ergebnis	
			Fibroblasten	Keratinocyten ( <i>Stratum basale</i> )
DNA-Reparatur	Immunhistochemischer Nachweis von γH2AX und 53BP1 als Marker für DSBs		✓	✓
	Nachweis der Induktion von DSBs 15 min nach Bestrahlung mittel 53BP1-Focianalyse	K vs. 1 Gy	↑ ****	↑ ****
	Nachweis der Dosisabhängigkeit der Anzahl 53BP1-Foci	4 Gy vs. 10 Gy	↑ ****	↑ ***
	Untersuchung der DSB-Reparaturkapazität mittels 53BP1-Foci Analyse	4 h vs. 10 h	↓ ****	↓ ***

**Tabelle 4: Einfluss naher Infrarotstrahlung auf die röntgeninduzierte Schadensantwort in FTSM**

↑Anstieg, ↓Abfall, - kein Effekt, \* P<0,05, \*\* P<0,01, unpaired two-tailed students t-test CI=95%, ns. nicht signifikant

Endpunkt	Methode	Zeitpunkt		Ergebnis	
				Fibroblasten	Keratinozyten (Stratum basale)
DSB-Reparatur	53BP1-Foci Analyse	15 min	S/1 Gy vs. NIR/1 Gy	↓ns.	↓*
		4 h	S/4 Gy vs. NIR/4 Gy	↑**	↑**
		4 h	S/10 Gy vs. NIR/10 Gy	↓**	↓*
		24 h	S/4 Gy vs. NIR/4 Gy	↑*	↑ns.
Apoptose	TUNEL-Assay	24 h	S/4 Gy vs. NIR/4 Gy	↓ns.	
Proliferation	Immunhistochemischer Nachweis BrdU-Einbau	24 h	S/4 Gy vs. NIR/4 Gy		↑**
	Immunhistochemischer Nachweis Ki-67	24 h	S/4 Gy vs. NIR/4 Gy		—

**Tabelle 5: Molekulare Mechanismen**

↑Anstieg, ↓Abfall, \* P<0,05, \*\* P<0,01, unpaired two-tailed students t-test CI=95%, nd. Signifikanz nicht definiert

Endpunkt	Methode	Zeitpunkt		Ergebnis
DNA-Reparatur	Immunhistochemischer Nachweis H3K9me3	15 min	S/4 Gy vs. NIR/4 Gy	↓ *
	Immunhistochemischer Nachweis H3K9me3	24 h	S/4 Gy vs. NIR/4 Gy	↑ *
	Western Blot-Analyse pKAP1 ( <i>Ser824</i> )	15 min	S/4 Gy vs. NIR/4 Gy	↑nd.
	Western Blot-Analyse pATM ( <i>Ser1981</i> )	15 min	S/10 Gy vs. NIR/10 Gy	↓nd.
FOXM1-Signalweg	RT-PCR Analysen <i>foxm1</i>	24 h	S/4 Gy vs. NIR/4 Gy	↓ **
	RT-PCR Analysen <i>auroraB</i> , <i>nek2</i> , <i>plk1</i> , <i>cenpA</i> , <i>xrcc1</i>	24 h	S/4 Gy vs. NIR/4 Gy	↓
	RT-PCR Analysen <i>cenpB</i>	24 h	S/4 Gy vs. NIR/4 Gy	↓ **
Proteine	Western Blot-Analyse PARP-1	15 min	S/10 Gy vs. NIR/10 Gy	↓nd.
	Western Blot-Analyse PARP-1	8 h	S/10 Gy vs. NIR/10 Gy	↑nd.
	PathScan-Analyse Ikbα	24 h	S/10 Gy vs. NIR/10 Gy	↑ *
	PathScan-Analyse pIkbα ( <i>Ser32/36</i> )	24 h	S/10 Gy vs. NIR/10 Gy	↑ **

**Tabelle 6: wIRA und NIR im Vergleich**

↑Anstieg, \*\*\*\* P<0,0001, unpaired two-tailed students t-test CI=95%, ns. nicht signifikant

Endpunkt	Methode	Zeitpunkt		Ergebnis
Proliferation	Immunhistochemischer Nachweis BrdU-Einbau	24 h	S/4 Gy vs. NIR/4 Gy	↑ ****
Reaktive Sauerstoffspezies	Immunfluoreszenzmessung DCFDA	24 h		↑ ns.

---

## 7. Diskussion

---

In vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Vorbestrahlung mit nahem Infrarot die zelluläre Stressantwort auf die Bestrahlung mit therapierelevanten Röntgendosen maßgeblich verändert [6-11, 34]. Sowohl in *Tradescantia*, *Drosophila Melanogaster* als auch in humanen sowie murinen Zelllinien hat die Kombination dieser beiden Strahlenqualitäten im Vergleich zur exklusiven Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen eine verstärkt schädigende Wirkung auf die genomische Integrität. Da ein erhöhtes Vorkommen genomischer Instabilität die Gefahr der vollständigen zellulären Entartung und so die Entstehung von Tumorstammzellen begünstigt [206], ist die Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen sowie die Beurteilung des Risikos für Patienten von großer medizinischer Relevanz.

Im Klinikalltag wird ionisierende Strahlung in den hier verwendeten Dosen in der Onkologie zur nichtinvasiven Reduktion von malignen Tumoren verwendet [2]. Infrarotstrahlung hingegen wird in der Medizin vor allem zur Schmerzlinderung eingesetzt [5]. *Abraham et al.* zeigen in einer neueren Studie jedoch, dass NIR auch unterstützend zum Erfolg einer röntgenbasierten Krebstherapie beitragen kann [1]. Neben der medizinischen Anwendung reicht, je nach Region, jedoch schon ein 15-30 minütiger Spaziergang, um eine Infrarotexposition mit der hier verwendeten Dosis von  $360 \text{ kJ/m}^2$  zu erreichen. Eine kombinierte Applikation der beiden Strahlenarten ist somit im Zuge einer onkologischen Strahlentherapie durchaus wahrscheinlich, was ebenfalls zur Relevanz der Untersuchung der kombinierten Bestrahlung beiträgt.

Da die bisherigen Studien in *Tradescantia*, *Drosophila Melanogaster* und verschiedenen Zelllinien durchgeführt wurden, ist es für die Risikoabschätzung der kombinierten Bestrahlung für den Menschen von großer Bedeutung, die bisher erbrachten Ergebnisse in humanem Gewebe zu verifizieren. Besonders gut geeignet für diese Untersuchung ist die Haut, da sowohl NIR als auch Röntgenstrahlen alle Schichten dieses Organs durchdringen und so jeder Zelltyp von der kombinierten Bestrahlung betroffen sein kann [54]. In dieser Arbeit wurde deshalb ein humanes Vollhautmodell (FTSM) für die Untersuchung der modulierenden Wirkung von NIR auf den Ausgang einer Röntgenbestrahlung etabliert. In diese organotypische *in vitro*-Kultur werden die zwei Hauptzelltypen der Haut integriert und bilden unter bestimmten Kulturbedingungen alle epidermalen sowie dermalen Schichten aus. Durch die verschiedenen Zelltypen sowie Differenzierungsstadien spiegelt eine solche Kultur die Komplexität des menschlichen Organismus sehr gut wider. Bei der Analyse der FTMS zeigte sich, dass die Vorbestrahlung mit NIR einen signifikanten Einfluss auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen sowie die Proliferationsrate nach Röntgenbestrahlung hat. Des Weiteren beeinflusste NIR die röntgeninduzierte Apoptoserate.

---

Parallel zur diesen Untersuchungen wurden Versuche zur näheren Charakterisierung der in den kombiniert bestrahlten Zellen variierenden molekularen Mechanismen im Monolayer durchgeführt. Hierbei ergaben sich erste Hinweise darauf, dass die Vorbestrahlung mit NIR einen Einfluss auf die Chromatinverteilung hat. Des Weiteren ließen sich Effekte der kombinierten Bestrahlung auf Proteine wie KAP1, ATM, I $\kappa$ B $\alpha$ , und PARP-1 zeigen. Genexpressionsanalysen verschiedener Mitglieder des FOXM1-Signalweges lassen darüber hinaus den Schluss einer Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors an der Entstehung der NIR-Effekte zu. Außerdem konnte gezeigt werden, dass viele der bisher beobachteten Effekte in den ersten 24 h nach NIR auf die applizierte Infrarotdosis, spätere Effekte jedoch auf die Expositionsdauer zurückzuführen sind.

### 7.1. Etablierung eines humanen Vollhautmodells für strahlenbiologische Fragestellungen

Da zu den hier verwendeten FTSM noch keine strahlenbiologischen Daten vorlagen, musste vorab geprüft werden, ob in den integrierten Zellen die Signalkaskaden der DNA-Schadensantwort aktiviert werden. Hierfür wurden FTSM mit unterschiedlichen Röntgendosen bestrahlt und anschließend die Markierung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB), die Induktion, die Dosisabhängigkeit sowie die Reparaturkapazität mittels Foci-Analyse überprüft.

Immunhistochemisch ließ sich 15 min nach der Bestrahlung mit 1 Gy eine deutliche Induktion colokalisierender  $\gamma$ H2AX- sowie 53BP1-Focistrukturen sowohl in den epidermalen Zellen des *Stratum Basale* als auch in den Fibroblasten der Dermis nachweisen. Die Anzahl endogener Foci lag hierbei unabhängig vom Zelltyp zu jedem untersuchten Zeitpunkt unter einem Focus pro Zelle. Bei der quantitativen Foci-Analyse 4 h nach der Bestrahlung konnte weiterhin gezeigt werden, dass in 10 Gy bestrahlten FTSM deutlich mehr DSBs verursacht wurden, als in den mit 4 Gy bestrahlten Hautmodellen. 24 h nach der Bestrahlung mit 4 Gy war die Zahl der 53BP1-markierten DSBs im Vergleich zur selben Dosis 4 h nach der Bestrahlung deutlich reduziert.

Sowohl die phosphorylierte Form des Histons H2AX ( $\gamma$ H2AX) als auch akkumuliertes 53BP1 sind zuverlässige Marker für die Induktion eines Doppelstrangbruchs [73-77]. In der Arbeit von *Heslich et al.* wurde die Quantifizierung von DSB mit Hilfe von  $\gamma$ H2AX durchgeführt [11]. Im Gewebe ist dieser Marker jedoch häufig schlecht zu analysieren, weshalb die Untersuchung von DSBs dort meistens mit Hilfe von 53BP1 durchgeführt wird [207, 208]. Die Akkumulation dieses Proteins führt zu sehr gut erkennbaren Focistrukturen, was die Quantifizierung von DSBs deutlich erleichtert. Bei der immunhistochemischen Untersuchung der FTSM nach 1 Gy zeigte sich, dass auch hier die Akkumulation des 53BP1-Proteins sehr viel deutlicher zu erkennen war. Durch die Colokalisation von

---

$\gamma$ H2AX- und 53BP1-Foci in den Fibroblasten sowie in den basalen Keratinozyten erwies sich 53BP1 als geeignet für die vergleichenden Untersuchungen im FTSM.

Dass die Kontrollzellen zu jedem untersuchten Zeitpunkt ein sehr geringes endogenes Foci-Level aufweisen, lässt den Schluss zu, dass die hier verwendeten Spenderzellen eine intakte DNA-Struktur aufweisen. Bei der quantitativen Auswertung zum Induktionszeitpunkt 15 min nach der Bestrahlung zeigte sich, dass durch 1 Gy in den hier verwendeten FTSM etwa zehn Foci pro Zelle induziert werden. In der Literatur wird für andere *in vitro*-Hautmodelle zwar eine wesentlich geringere Zahl von 3-4 Foci pro Gy angegeben, diese Diskrepanz lässt sich jedoch über zwei Wege erklären [209, 210]. Zum einen kann die Anzahl der markierten DSBs zum Induktionszeitpunkt in Abhängigkeit des verwendeten Zellspenders variieren [211]. Zum anderen wurde die mikroskopische Auswertung in dieser Arbeit mit Hilfe konfokaler Lasermikroskopie durchgeführt, was eine deutlich bessere Auflösung ermöglicht, wodurch einzelne Foci im Gewebe unter Umständen visuell besser voneinander zu unterscheiden waren, als das bei herkömmlichen Mikroskopieverfahren der Fall ist. Mit der Literatur konform geht die Beobachtung, dass in der Epidermis nur die noch teilungsfähigen Zellen des *Stratum Basale* sowie einige wenige Zellen des *Stratum Spinosum* 53BP1-Foci nach Bestrahlung ausbilden [209, 210, 212]. *Suzuki et al.* erklären dieses Phänomen mit dem Fortschreiten der terminalen Differenzierung in den oberen epidermalen Schichten und der daraus resultierenden stärkeren Kondensation des Chromatins [209]. Diese ausschließliche Markierung von DSBs in den unteren Schichten der Epidermis hatte für diese Arbeit den großen Vorteil, dass bei der Quantifizierung der röntgeninduzierten Foci im Folgenden potenziell teilungsfähige Keratinozyten, ohne zusätzlichen immunhistochemischen Nachweis des Differenzierungsgrads, sehr gut von terminal differenzierenden Zellen unterschieden werden konnten.

Neben der Induktionsfähigkeit von DSBs konnte auch eine dosisabhängige Anzahl DSBs in den hier verwendeten *in vitro*-Hautkulturen nachgewiesen werden, was ein weiteres wichtiges Kriterium für die Eignung einer solchen Kultur für die Beantwortung strahlenbiologischer Fragestellungen ist.

Die wohl wichtigste Bedingung für die Tauglichkeit der FTSM ist jedoch die tatsächliche Reparaturfähigkeit der Zellen. Weder der Nachweis der Phosphorylierung von H2AX, noch der der Akkumulation von 53BP1 zu einem frühen Zeitpunkt nach der Bestrahlung reichen aus, um darauf schließen zu können, ob die durch Röntgenbestrahlung entstandenen DSBs nachfolgend auch wirklich repariert werden.  $\gamma$ H2AX übernimmt in der DSB-Reparatur eine signalgebende Funktion und hilft als Bindestelle wichtiger Reparaturfaktoren bei deren Rekrutierung sowie Verbleib am DSB, wodurch es jedoch eher eine passive Rolle bei der Reparatur spielt [76]. Auch 53BP1 ist kein direktes Reparaturprotein, wodurch auch der Nachweis von 53BP1-Foci nur Marker für die Existenz von DSBs, nicht aber für die Durchführung der Reparatur ist [213]. Da nach Abschluss der DSB-Reparatur die



---

Akkumulation von 53BP1 jedoch wieder aufgehoben wird, kann, über eine Reduktion der Anzahl 53BP1-markierter DSBs zu einem späteren Zeitpunkt, indirekt auf die Aktivierung der typischen Reparaturkaskaden geschlossen werden. Wie erwartet, wurde die Anzahl röntgeninduzierter Foci zwischen 4 und 24 h nach der Bestrahlung mit 4 Gy in den hier verwendeten FTSM deutlich reduziert. Interessanterweise lag diese jedoch nach wie vor signifikant höher als in den Kontrollmodellen. Nachweislich ist in humanen Keratinozyten sowie murinen Fibroblasten in der Monolayerzellkultur die DSB-Reparatur zu diesem Zeitpunkt vollständig abgeschlossen [11, 210]. Für humane Hautmodelle wurde eine solche Verzögerung jedoch schon von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben [209, 210, 212]. Diese Persistenz unreparierter DSBs wird in diesen Publikationen ebenfalls in Zusammenhang mit einer veränderten Chromatinstruktur von Zellen im Gewebe gebracht [210], von *Su et al.* aber auch als eine Art Zelltodsignal diskutiert [212]. Weiterhin wäre es denkbar, dass die DNA-Reparatur in Zellen im dreidimensionalen Gewebeverbund im Vergleich zu Zellen in der 2D-Zellkultur zeitlich andersartig organisiert wird. Solche aus der Art der Kultivierung resultierenden Unterschiede in der röntgeninduzierten Schadensantwort wurden bereits 2007 von *Indovina et al.* beschrieben. MG-63-Zellen in der 2D-Zellkultur wiesen vermehrt das Auftreten von *Mitotischen Katastrophen* als Folge einer Bestrahlung mit 5 Gy auf, dieselben Zellen im 3D-Verbund induzierten jedoch stattdessen den Zelltod über den Signalweg der Apoptose [214].

Da die Ergebnisse der Untersuchung der DNA-Schadensantwort in den FTSM im Großen und Ganzen mit den bisher zu vergleichbaren humanen Hautmodellen publizierten Ergebnissen übereinstimmen, kann davon ausgegangen werden, dass sie für die Untersuchung der Wirkung naher Infrarotstrahlung auf die röntgeninduzierte Stressantwort sehr gut geeignet sind.

## **7.2. NIR hat im FTSM Einfluss auf die strahleninduzierte Stressantwort**

Ziel dieser Arbeit war vor allem die Untersuchung der Relevanz bereits in Monolayerzellkulturen erbrachter Ergebnisse für Zellen im humanen Gewebe. Hierfür wurden humane Vollhautmodelle (FTSM) mit Hilfe von Spenderzellen generiert und vorab ihre Tauglichkeit für die Beantwortung strahlenbiologischer Fragestellungen über die Untersuchung der DNA-Schadensantwort verifiziert (7.1.). Zu den Parametern, die in der Monolayerzellkultur durch eine Vorbestrahlung mit NIR modifiziert wurden, gehören die DNA-Doppelstrangbruch (DSB)-Reparatur sowie die Proliferationsrate nach ionisierender Strahlung. Auf die röntgeninduzierte Apoptoserate zeigte sich in der Monolayerkultur hingegen kein verändernder NIR-Einfluss, jedoch konnte eine erhöhte Anzahl *Mitotischer Katastrophen* (MC) in den kombiniert bestrahlten Zellen nachgewiesen werden [11]. Mit

---

Hilfe dieser Endpunkte sollte deshalb untersucht werden, ob NIR auch im Gewebe die Antwort von Zellen auf Röntgenstrahlung modifiziert.

#### 7.2.1. DSB-Reparatur in kombiniert bestrahlten FTSM

In NIH/3T3-Monolayerzellkulturen hat die NIR-Vorbestrahlung keinen Einfluss auf die Induktion von DSBs nach 1 Gy. 4 h nach der Bestrahlung mit 4 und 10 Gy zeigte sich in den mit NIR vorbestrahlten Zellen jedoch eine erhöhte Persistenz der röntgeninduzierten DSBs, verglichen mit der ausschließlichen Bestrahlung mit beiden Röntgendosen. Nach 24 h war die Reparatur der DSBs sowohl in den kombiniert bestrahlten als auch in den exklusiv mit Röntgen bestrahlten Zellen vollständig abgeschlossen [11]. Für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieser von *Heslich et al.* durchgeführten Studie mit möglichen Effekten im FTSM, wurden sowohl die Röntgendosen als auch die Untersuchungszeiträume analog gewählt.

Interessanterweise zeigt sich im FTSM schon 15 min nach der Bestrahlung mit 1 Gy, anders als in der Monolayerzellkultur, ein Einfluss der NIR-Vorbestrahlung. Sowohl in den Fibroblasten als auch in den Keratinozyten des FTSMs führt die kombinierte Bestrahlung zu einer reduzierten Induktion von DSBs. 4 h nach der Bestrahlung mit 4 Gy zeigt sich in beiden Zelltypen im FTSM das gleiche Bild wie in NIH/3T3-Monolayerkulturen. Sowohl in den Fibroblasten als auch in den Keratinozyten kommt es zu einer erhöhten Anzahl unreparierter DSBs durch die Kombination aus NIR und ionisierender Strahlung. 4 h nach der Bestrahlung mit 10 Gy dreht sich dieser NIR-Effekt jedoch deutlich um. Beide Zelltypen weisen nach NIR und dieser hohen Röntgendosis signifikant weniger DSBs auf als nach 10 Gy alleine. Während die Reparatur röntgeninduzierter DSBs im Monolayer nach 24 h vollständig abgeschlossen ist, ist das Level an 53BP1-Foci in Zellen im FTSM zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zu den Kontrollmodellen noch signifikant erhöht. Auch der Einfluss der nahen Infrarotstrahlung zeigt sich zu diesem Zeitpunkt noch deutlich. In den doppeltbestrahlten Fibroblasten ist die Anzahl der verbliebenen DSBs noch immer signifikant höher als in den ausschließlich mit Röntgen bestrahlten Zellen. Dieser Effekt zeigt sich tendenziell auch in den Keratinozyten.

Die Vorbestrahlung mit nahem Infrarot hat im FTSM folglich schon zu einem viel früheren Zeitpunkt eine modulierende Wirkung, die, verglichen mit der Monolayerkultur, zudem länger anhält. Eine mögliche Erklärung für den veränderten zeitlichen Verlauf der DNA-Reparatur nach NIR und Röntgenstrahlung in FTSM im Vergleich zur 2D-Zellkultur könnte der Unterschied der Chromatinverteilung in den jeweiligen Zellen sein. Die Zusammensetzung des Chromatins variiert sowohl im Verlauf des Zellzykluses als auch im Zuge der Differenzierung dramatisch [215]. Die DNA von Zellen, die den Zellzyklus verlassen und mit der terminalen Differenzierung beginnen, wird im Laufe dieses Prozesses zunehmend kondensiert und zu Heterochromatin (HC) umgewandelt [216].

---

Diese zunehmende Kondensation der DNA dient der Stilllegung von Genen, die in den differenzierenden Zellen nicht mehr benötigt werden oder gar die Differenzierung stören würden. Die immortalisierten Zellen der NIH/3T3-Zelllinie sind unbegrenzt teilungsfähig und zeigen eine sehr heterogene Zellzyklusverteilung in der Gesamtzellpopulation einer Zellkultur, ihr Differenzierungsgrad hingegen ist sehr einheitlich. Die primären Fibroblasten in der Dermis befinden sich alle in einem ruhenden G1/G0-Zustand, können aber bei Bedarf jederzeit wieder aktiv in den Zellzyklus eintreten. Die Keratinozyten der epidermalen Basalzellschicht zeigen im Gegensatz dazu sehr heterogene Differenzierungsstadien. Einige dieser Zellen haben Stammzellcharakter, andere, die sogenannten Amplifikationszellen, sind zwar ebenfalls noch einige Male teilungsfähig, ihre terminale Differenzierung hat jedoch bereits begonnen [19, 22]. Die Zellen im FTSM-Gewebeverbund weisen somit vermutlich durch den ruhenden Zustand und die beginnende Differenzierung im Vergleich eine größere Menge HC auf, als die immortalisierten NIH/3T3. Die Reparatur von DSBs verläuft in Abhängigkeit des umgebenden Chromatins biphasisch. Brüche, die im Euchromatin lokalisiert sind, werden innerhalb der ersten Stunden nach der Entstehung des Schadens repariert, während die Reparatur von heterochromatischen DSBs einige Stunden bis Tage dauern kann [99, 101, 102]. Zellen, die im Gewebeverbund einen größeren Anteil heterochromatischer DNA-Bereiche aufweisen, haben somit auch eine höhere Wahrscheinlichkeit für DSBs im Heterochromatin, deren Reparatur wiederum verzögert verläuft. *Acheva et al.* erklären hierüber die erhöhte Persistenz unreparierter DSBs in humanen Vollhautmodellen im Vergleich zu Monolayerzellkulturen [210].

Mit Hilfe von Monolayerversuchen konnte im Zuge dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass NIR in NIH/3T3-Zellen 24 h nach der Bestrahlung eine erhöhte Trimethylierung des Histons H3 an Lysin 9 zur Folge hat. Da diese Histonmodifikation ein Marker für heterochromatische DNA-Bereiche ist [100], kann davon ausgegangen werden, dass Monolayerzellen, die mit NIR bestrahlt wurden, zu diesem Zeitpunkt vermehrt HC-Bereiche aufweisen. Sollte NIR einen solchen Einfluss auch auf die Zellen im FTSM haben, deren Anteil heterochromatischer DNA an sich schon erhöht ist, könnte hierüber erklärt werden, warum sich der Einfluss der nahen Infrarotstrahlung auf die DSB-Reparatur schon zum Induktionszeitpunkt zeigt und über 24 h erhalten bleibt. Eine durch NIR hervorgerufene verstärkte Kondensation der DNA würde die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von heterochromatischen Brüchen zusätzlich erhöhen.

Für die Markierung eines im Heterochromatin lokalisierten DSBs muss die dichtgepackte Chromatinstruktur rund um den Schaden aufgeweicht werden, da die Reparaturfaktoren sonst nicht an den Bruch gelangen können [12]. Zellen, die durch die Differenzierungsvorgänge schon vermehrt Bereiche aufweisen, die für die Proteine der Reparaturmaschinerie schwer zugänglich sind, könnten durch die NIR-induzierte zusätzliche Verdichtung der DNA in zunehmendem Maße Schwierigkeiten bei der initialen Markierung der DSBs bekommen. Des Weiteren könnte die NIR-Vorbestrahlung einen

---

Einfluss auf die aktivierende Phosphorylierung der Proteine habe, die für die Markierung von DSBs verantwortlich sind. Sowohl das erhöhte Level heterochromatischer Brüche als auch die fehlende Aktivierung der initialen Proteine der Reparaturkaskade würden dazu führen, dass zum untersuchten Zeitpunkt zwar sowohl durch 1 Gy als auch durch NIR und 1 Gy gleich viele DSBs induziert wurden, diese in den mit NIR vorbestrahlten Proben jedoch verspätet markiert würden. Verschiedene Publikationen zeigen, dass das Maximum der induktiven Markierung von DSBs im Monolayer bei 30 min und in humanen Hautmodellen bei ca. 1 h liegt [209, 217]. In folgenden Arbeiten könnten deshalb auch solche späteren Zeitpunkte nach der kombinierten Bestrahlung näher betrachtet werden, um abzuklären, ob die Induktion nach NIR und ionisierender Strahlung tatsächlich verlangsamt einsetzt, zu einem späteren Zeitpunkt aber ein vergleichbares Level erreicht wird oder ob die Markierung durch die fehlerhafte Aktivierung der Markierungskaskade sogar gestört ist.

Die durch NIR-Vorbestrahlung erhöhte Anzahl DSBs 4 h nach der Bestrahlung mit 4 Gy, ließe sich ebenfalls über einen durch NIR veränderten Chromatinstatus erklären. Während ausschließlich mit 4 Gy bestrahlte Zellen mehr euchromatische Brüche hätten, die in den ersten 4 h nach der Entstehung repariert würden, bräuchten mit NIR vorbestrahlte Zellen durch die Lokalisation vermehrter Brüche im HC hingegen deutlich länger, um eine entsprechende Anzahl DSBs zu reparieren. Durch diese Chromatin-abhängige zeitliche Verzögerung der Reparatur ließe sich die Differenz zwischen den mit 4 Gy und den mit NIR und 4 Gy bestrahlten FTSM zu 4 h nach der Röntgenbestrahlung sehr gut argumentieren. Darüber hinaus könnte allerdings auch eine verzögert beginnende DSB-Reparatur zu dem Phänomen der erhöhten Persistenz von DSBs in den mit NIR vorbestrahlten FTSM führen. Durch die fehlende induktive Markierung einiger DSBs in kombiniert bestrahlten FTSM kann die Reparatur eben dieser DNA-Schäden möglicherweise erst verspätet einsetzen, was dazu führen würde, dass auch die schnelle Komponente der DSB-Reparatur im Euchromatin zu 4 h nach der Bestrahlung noch nicht vollständig abgeschlossen wäre [99].

Der Effekt, der sich in den mit NIR und 10 Gy bestrahlten Zellen zeigt, würde diesen beiden Vermutungen erst einmal widersprechen. Im Monolayer ist der Effekt der erhöhten Persistenz von röntgeninduzierten DSBs in NIR vorbestrahlten Zellen unabhängig von der verwendeten Röntgendosis. Im FTSM zeigt sich im Gegensatz dazu eine scheinbar verbesserte Reparatur nach NIR und 10 Gy. Dieser Effekt kann verschiedene Ursachen haben, die mit der Steigerung der Dosis zusammenhängen. So zeigten *Tokalov und Iaguno* 2011 beispielsweise, dass EAC-Zellen dosisabhängig zwischen 2-8 Gy und 10-20 Gy unterschiedliche Zellzyklusarreste initiieren [218]. Das Einleiten eines Zellzyklusstopps wird je nach Zellzyklusphase durch verschiedene Proteine umgesetzt. Durch die Bestrahlung mit höheren Dosen wurden hier zusätzliche Signalkaskaden aktiviert, die vermutlich mit dem erhöhten Schadenslevel der Zellen zusammenhängen. Auch in den mit 10 Gy bestrahlten FTSM ist eine solche Veränderung der aktivierten Signalwege durchaus vorstellbar, wodurch es zu einem dosisabhängigen

---

Switch in der Schadensantwort käme. Sollten die Zellen tatsächlich andere oder weitere Proteine aktivieren, könnte sich dies auch nach der kombinierten Bestrahlung auswirken, wodurch eine beschleunigte Reparatur in der Tat möglich wäre. Des Weiteren wäre aber auch denkbar, dass der Schaden in den kombiniert bestrahlten Zellen 4 h nach der Bestrahlung eben durch die erhöhte Persistenz unreparierter DSBs so hoch ist, dass ausgewählte Zellen mit einem zu hohen Schadenslevel frühzeitig in die Apoptose eintreten. In die Quantifizierung der DSBs würden so nur noch Zellen mit einem geringeren Schadenslevel eingehen, was bedeuten würde, dass die Reparatur nicht beschleunigt wäre, sondern in einigen Zellen gar nicht erst umgesetzt würde. Für dieses frühe Einsetzen der Apoptose nach der Kombination aus NIR und 10 Gy spricht auch die im Monolayer durch die Vorbestrahlung mit NIR 24 h vor 10 Gy induzierte Herunterregulation des antiapoptotischen Proteins Bcl2 [199].

Über ein erhöhtes Level an HC-DSBs durch NIR ließe sich auch der anhaltende Effekt der Doppelbestrahlung 24 h nach der Bestrahlung mit 4 Gy sehr gut erklären. Da schon die Reparatur nach der exklusiven Bestrahlung mit 4 Gy im Vergleich zur Zellkultur verzögert verläuft, könnte sich das erhöhte Level persistierender DSBs in den kombiniert bestrahlten FTSM daraus ergeben, dass hier noch deutlich mehr DSBs in heterochromatischen Bereichen der DNA lokalisiert sind, die zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig repariert wurden. Die schnelle Komponente der euchromatischen DSB-Reparatur ist unter normalen Bedingungen im Monolayer nach 4 h abgeschlossen [99], weshalb es schwer vorstellbar ist, dass die verzögerte Induktion noch zu einem solch späten Zeitpunkt Einfluss auf die Reparatur von DSBs haben soll. Da diese sich aber wahrscheinlich nicht nur auf die initiale Markierung der euchromatischen Brüche auswirken würde, sondern auch Einfluss auf die Reparaturkinetik heterochromatischer DSBs hätte, könnten in den kombiniert bestrahlten FTSM auch ohne eine erhöhte Kondensation der DNA durch NIR noch mehr unreparierte HC-DSBs vorhanden sein.

#### **7.2.2. Einfluss der kombinierten Bestrahlung auf Apoptose und Proliferation im FTSM**

Neben der Theorie, dass Zellen im Gewebeverbund durch ein erhöhtes Vorkommen heterochromatischer DNA-Bereiche verzögert reparieren, diskutieren *Su et al.*, dass persistierende DSBs in FTSM möglicherweise als Zelltodsignal dienen könnten [212]. *Yunis et al.* beschreiben, dass die Bestrahlung mit 1 Gy in der Gesamtzellpopulation humaner Hautmodelle zu einer signifikanten Hochregulation der Expression verschiedener pro-apoptotischer Gene führt [219].

Tatsächlich zeigen sich 24 h nach der Bestrahlung mit 4 Gy auch in den hier verwendeten FTSM vermehrt apoptotische Fibroblasten im TUNEL-Assay. Nach der Hypothese von *Su et al.* müsste die Apoptoserate in den kombiniert bestrahlten FTSM, durch die zusätzliche Anzahl unreparierter DSBs, darüber hinaus erhöht sein. Ganz im Gegenteil zeigt sich jedoch nach NIR und 4 Gy ein verminderter

---

Prozentsatz apoptotischer Zellen, woraus sich schließen lässt, dass die erhöhte Persistenz von DNA-Doppelstrangbrüchen in den kombiniert bestrahlten FTSM nicht als Apoptosesignal zu werten ist. Eine mögliche Erklärung für die verminderte Anzahl apoptotischer Zellen in den hier verwendeten Hautmodellen könnte aus den Studien von *Menezes et al.*, *Frank et al.*, sowie *Jantschitsch et al.* abgeleitet werden. In all diesen Arbeiten wurde durch eine Vorbestrahlung mit nicht-thermischem Infrarot eine deutliche Reduktion UV-induzierter Apoptosen beobachtet [50, 51, 220, 221]. Diese protektive Wirkung der NIR-Vorbestrahlung ergab sich aus der Hochregulation verschiedener anti-apoptotischer Faktoren, wie beispielsweise Bax, zum Zeitpunkt der UVB-Bestrahlung. Auch wirkt die Vorbestrahlung mit NIR inhibierend auf die Aktivierung verschiedener Caspasen nach UVB, was zusätzlich zur Hemmung apoptotischer Vorgänge führt [50]. Da zwischen der NIR-Vorbestrahlung und der anschließenden UVB-Bestrahlung analog zu den hier durchgeführten Versuchen 24 h lagen, scheint NIR auch in den Zellen des FTSM eine Modulation anti-apoptotischer Prozesse zum Zeitpunkt der Röntgenbestrahlung zur Folge zu haben. Interessanterweise konnte in den Studien von *Frank et al.* in den ersten 24 h nach der Bestrahlung mit NIR eine Hochregulation pro-apoptotischer Faktoren nachgewiesen werden, die erst durch die zusätzliche Bestrahlung mit UVB ins Gegenteil umschlug [50]. In den hier verwendeten FTSM kommt es durch die reine Bestrahlung mit nahem Infrarot zu einem leichten Anstieg TUNEL-positiver Fibroblasten im Vergleich zur Sham-Kontrolle. Die protektive NIR-Wirkung zeigt sich auch hier nur in Kombination mit ionisierender Strahlung. NIR scheint somit auch in FTSM die Balance zwischen pro- und anti-apoptotischen Signalen zu modulieren, was sowohl für den Anstieg der Apoptosen nach NIR als auch deren Reduktion nach der Kombination aus NIR und Röntgen verantwortlich sein kann.

In Monolayerzellkulturen hat die Vorbestrahlung mit nahem Infrarot zwar keinen Einfluss auf die Induktion apoptotischer Signalwege, indes kam es durch die kombinierte Bestrahlung aus NIR und Röntgenstrahlung jedoch zu einem signifikanten Anstieg *Mitotischer Katastrophen* (MC) [11]. Diese atypische Kernmorphologie wird in der Literatur als eine Art proliferativer Zelltod beschrieben, da sie nach der Behandlung von Zellen mit DNA-schädigenden Agenzien aus aberranten Mitosen entsteht [201, 222]. Unter Berücksichtigung des MC-fördernden Effekts im Monolayer könnte die verminderte Apotoserate der Fibroblasten in den kombiniert bestrahlten FTSM, neben der möglicherweise protektiven Wirkung der Vorbestrahlung, auch über eine Verschiebung der Entstehung röntgeninduzierter Apoptosen hin zur Entstehung *Mitotischer Katastrophen* zu Stande kommen. Da es bisher jedoch außer der Kernmorphologie noch keinen experimentell nachweisbaren molekularen Marker für die MC gibt, ist es im Gewebe sehr schwer nachzuvollziehen, ob diese Art des Zelltodes durch eine Behandlung induziert wurde. Für diese Annahme würde jedoch die bereits mehrfach nachgewiesene proliferationsfördernde Wirkung der Bestrahlung mit Wellenlängen des nahen



---

Infrarotspektrums in Fibroblasten sprechen [221, 223], die im Zuge dieser Arbeit auch für Keratinozyten im Gewebeverbund bestätigt werden konnte. Sowohl im FTSM, als auch in *in vitro*-Maushautkulturen sowie in humanen Epidermismodellen nahm die Anzahl proliferierender Keratinozyten im *Stratum Basale* durch die Bestrahlung mit 360 kJ/m<sup>2</sup> NIR zu (s. Anhang 8.1). Somit waren zum Zeitpunkt der Röntgenbestrahlung, zumindest im *Stratum Basale*, mehr Zellen auf dem Weg in die Mitose bzw. mittendrin. Sollte NIR einen solchen Einfluss auch auf die im FTSM integrierten Fibroblasten haben, würde dies die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung der *Mitotischen Katastrophe* durch ionisierende Strahlung deutlich erhöhen.

Dass dieser proliferationsfördernde Einfluss der NIR-Bestrahlung jedoch nicht ausschließlich für eine mögliche Entstehung vermehrter MCs nach NIR und Röntgenstrahlung verantwortlich sein kann, lässt sich durch die Betrachtung der Ergebnisse der Monolayerversuche zeigen. Hier hatte die Bestrahlung mit 360 kJ/m<sup>2</sup> NIR gegenläufig einen proliferationshemmenden Einfluss und trotzdem eine erhöhte Anzahl MCs nach der Doppelbestrahlung zur Folge. Der Unterschied der Wirkung trotz gleicher Dosis könnte hierbei im Zusammenhang mit dem Ursprung der Zellen stehen. In den Monolayerversuchen wurde mit R28-Zellen gearbeitet. Bei diesen Zellen handelt es sich um retinale Vorläuferzellen aus p6-Ratten (Sprague-Dawley-Ratten; *Rattus norvegicus*), die mit Hilfe des SV40-Gens *12S E1A* immortalisiert wurden, wodurch ihre Teilungsfähigkeit dauerhaft erhalten bleibt [224]. Die im FTSM integrierten Zellen hingegen sind nicht-immortalisierte, primäre Spenderzellen, von denen im Gewebeverbund nur noch etwa 40% überhaupt teilungsfähig sind. *Peidaee et al.* wiesen nach, dass die Bestrahlung mit Wellenlängen des sichtbaren Lichts sowie des Infrarotspektrums unterschiedliche Effekte auf die Proliferation von MCF7 (Brustkrebszellen) im Vergleich zu primären Keratinozyten hat [225]. Aus dieser Arbeit ließe sich durchaus ableiten, dass genetisch veränderte oder entartete Zellen, die dauerhaft teilungsfähig sind, anders auf die Bestrahlung mit NIR reagieren können, als primäre Zellen.

Wie die Wellenlängen des NIR-Spektrums tatsächlich auf das Proliferationsverhalten von Zellen wirken, ist nach *Karu et al.* unter anderem vom Redoxzustand der *Cytochrom-C-Oxidase* abhängig [226]. Je nach Redoxzustand des Chromophors der COX, absorbiert es unterschiedliche Wellenlängen, wobei das hier verwendete breitbandige NIR-Spektrum sich sowohl aus proliferationshemmenden als auch proliferationsfördernden Wellenlängen zusammensetzt [226, 227]. Dass der Redoxzustand der COX je nach Ursprung der Zellen, ihrem genetischen Zustand, aber auch ihrem umgebenden *Microenvironment* variiert, ist hierbei durchaus vorstellbar. Vergleicht man Zellen im Monolayer mit denen im FTSM, so fällt auf, dass die im Monolayer kultivierten Zellen zu meist direkt von anderen Zellen umgeben sind, die Zellen im FTSM hingegen in eine ECM eingebettet sind. Auch variiert der Grad der Differenzierung im FTSM stark im Vergleich zur Monolayerzellkultur. All diese Faktoren

---

zusammengenommen, könnte die *Cytochrom-C-Oxidase* in der R28-Monolayerkultur somit möglicherweise eher in einem Redoxzustand vorliegen, der die Absorption von proliferationshemmenden Wellenlängen begünstigt, wohingegen die COX in den Zellen des FTSM unter Umständen vermehrt proliferationsfördernde Wellenlängen absorbieren könnte [226, 228, 229]. Hierfür spricht auch, dass der proliferationsfördernde Effekt der Bestrahlung im FTSM bis zu 48 h anhält, wohingegen auch zu diesem Zeitpunkt die Proliferation der Zellen im Monolayer weiterhin gehemmt ist. Ebenfalls für die These der Umkehr des Zelltodweges von der Apoptose hin zum proliferativen Zelltod spricht die Beobachtung, dass durch eine Vorbestrahlung mit nahem Infrarot sowohl im Monolayer als auch im FTSM vermehrt Zellen trotz der Bestrahlung mit ionisierender Strahlung proliferieren.

Nach der Bestrahlung mit ionisierender Strahlung aktivieren Zellen üblicherweise Mechanismen, die zur Unterbrechung des Zellzykluses führen [230]. Nachweisbar ist ein solcher strahlungsinduzierter Proliferationsstopp in primären Zellen sowohl über den reduzierten Einbau des Basenanalogs BrdU als auch über die Reduktion von Ki-67-positiven Zellkernen [231]. Mit Hilfe eines RNA-Arrays der Gesamtzellpopulation konnten *Yunis et al.* die Hochregulation Checkpoint-assoziiierter Gene und so die Induktion von Zellzykluscheckpoints nach ionisierender Strahlung auch in humanen Hautmodellen bestätigen [219].

24 h nach der Bestrahlung mit 4 Gy kam es in den hier verwendeten FTSM sowohl zu einer Abnahme der BrdU- als auch der Ki-67-positiven Zellen. Dem zu Folge wurden durch die Bestrahlung mit ionisierender Strahlung auch hier die Proteinkaskaden der Zellzykluscheckpoints aktiviert. Interessanterweise zeigte sich in den kombiniert bestrahlten FTSM ein anderes Bild. Zwar hatte die Bestrahlung auch hier eine Reduktion der Ki-67-positiven Zellen zur Folge, die Anzahl der Zellen, die in den 24 h nach der Röntgenbestrahlung durch die S-Phase gelaufen sind, ist hingegen, im Vergleich zur exklusiven Bestrahlung mit 4 Gy, signifikant erhöht. Zur Erklärung dieses interessanten Effekts der NIR-Vorbestrahlung sind zwei Ansätze denkbar. Zum einen könnte es sich bei den Zellen, die trotz der ionisierenden Strahlung BrdU-positiv sind um diejenigen handeln, die durch die NIR-Bestrahlung ohnehin in ihrer Proliferation angeregt wurden. Dagegen spricht jedoch, dass weder NIR alleine noch in Kombination mit Röntgenstrahlen einen Einfluss auf die Anzahl Ki-67-positiver Zellen hat. Unter beiden Bestrahlungsmodalitäten ist die Anzahl Zellen, die überhaupt zur Proliferation fähig sind, zu gleichen Teilen minimiert. Weshalb zum anderen auch denkbar wäre, dass es sich bei den BrdU-positiven Zellen nach der Kombination um solche handelt, deren Zellzykluscheckpoint-Verhalten durch die NIR-Vorbestrahlung gestört wurde. Dieser Einfluss der NIR-Vorbestrahlung könnte entweder zu einer Störung des röntgeninduzierten Proliferationsstopps oder sogar zu einem beschleunigten Verlauf des Zellzyklus führen. Diese Beobachtung unterstützt die These, dass in kombiniert bestrahlten



---

FTSM möglicherweise durch aberrante Zellzykluscheckpoints statt der Apoptose vermehrt MCs induziert werden könnten.

Da es neben der Möglichkeit, dass MCs als alternativer Zelltod zu werten sind, auch Publikationen gibt, die die Möglichkeit aufzeigen, dass solche Zellen durch die Fusion mit gesunden Zellen weiter teilungsfähig bleiben, ist die weiterführende Untersuchung der These des veränderten Zelltodes in FTSM von großer Relevanz zur Risikoabschätzung der kombinierten Exposition von Patienten [232, 233]. Sollte die erhöhte Proliferation durch die kombinierte Bestrahlung in FTSM tatsächlich zu mehr MCs führen, würde dies somit auch die Wahrscheinlichkeit für solche Fusionen erhöhen. Dies wäre im Falle der hier verwendeten FTSM darüber hinaus kritisch zu betrachten, da auch die gestörte DSB-Reparatur in den kombiniert bestrahlten FTSM zusätzliche Risiken für die Entartung von proliferierenden Zellen bergen würde.

### 7.2.3. Relevanz der erbrachten Ergebnisse für zukünftige Patienten

Der Ausgang einer Tumorthherapie hängt von vielen Faktoren ab. Neben dem Gesamtzustand des Patienten können verschiedene genetische Faktoren den Ausgang einer Behandlung maßgeblich beeinflussen. Auch das Zusammenspiel verschiedener Zelltypen sowie aller Organe haben Einfluss auf die Wirkung jeder Behandlung. Ergebnisse, die in der klassischen Monolayerzellkultur gewonnen wurden, können somit nicht generell auf Patienten übertragen werden, weshalb zur Einführung eines neuen Medikaments nach wie vor der Tierversuch zwischen der Zellkultur und dem Patienten steht. Aber auch bei diesem Vorgehen hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass es durchaus Probleme in der Übertragbarkeit von Ergebnissen aus dem Tierversuch auf den Menschen geben kann. Das wohl populärste Beispiel hierfür ist der Wirkstoff Thalidomid (Contergan) [234].

Vergleicht man die Morphologie der Haut von Mäusen mit der des Menschen, so wird deutlich, dass es zwischen den beiden Spezies gravierende Unterschiede gibt, die durchaus Einfluss auf die Wirkung eines Agens haben können. Mäuse verfügen beispielsweise über eine viel höhere Anzahl Haarfollikel und ihre Epidermis ist deutlich dünner als die des Menschen [24]. Für solche Fälle sollte im Zuge der Entwicklung neuer Therapiemethoden neben der klassischen Monolayerzellkultur und dem Tierversuch in Zukunft eine humane Gewebekultur zwischengeschaltet werden. Solche *in vitro*-Gewebekulturen würden es ermöglichen, schon vor dem Tierversuch die Verträglichkeit einer Behandlung für den Menschen an Organäquivalenten zu testen und so die Zahl nötiger Tierversuche stark minimieren.

In der dermatologischen Forschung werden solche humanen Gewebekulturen schon standardmäßig verwendet. Humane Vollhautmodelle, in die die zwei Hauptzelltypen integriert werden, können zur Untersuchung neuer Applikationen bereits verwendet werden.

---

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein solches Hautäquivalent für die Untersuchung der kombinierten Bestrahlung aus NIR und Röntgenstrahlung etabliert, welches sehr gut für eine grundlegende Abschätzung des tatsächlichen Risikos der kombinierten Bestrahlung für den Menschen geeignet ist, da es, anders als die klassische Monolayerkultur, die beiden Hauptzelltypen der Haut in ihrem gewebetypischen Mikroumfeld enthält. Zu diesen umgebenden Faktoren, die den Ausgang einer Behandlung maßgeblich beeinflussen können, gehören neben der hauttypischen ECM auch die Kommunikation verschiedener Zelltypen sowie Differenzierungsstadien, die in der Monolayerzellkultur völlig fehlen [18, 29-31].

In den hier verwendeten Hautmodellen ließ sich ganz klar zeigen, dass die im Monolayer gewonnen Erkenntnisse über den Einfluss einer NIR-Vorbestrahlung auf die röntgeninduzierte Zellantwort auch in *in vitro*-Hautkulturen von großer Relevanz sind. Neben der verlangsamten DNA-Reparatur durch die kombinierte Bestrahlung, ließ sich auch ein senkender Einfluss auf die Apoptoserate sowie ein steigender auf die Proliferation der Zellen im FTSM nachweisen. Diese Ergebnisse zusammengenommen, wäre es eher kritisch zu betrachten, Patienten einer solchen Kombination auszusetzen. Gegebenenfalls sollte eine Exposition mit NIR aus natürlichen oder künstlichen Quellen vermieden werden. Sollten die hier gezeigten Effekte der kombinierten Bestrahlung jedoch auch in malignem Gewebe auftreten, wäre es denkbar, eine Tumorbestrahlung mit einer vorgeschalteten NIR-Bestrahlung zu verknüpfen, was durchaus die Reduktion des Tumors beschleunigen könnte. Erste Anzeichen hierfür bieten die klinischen Beobachtungen von *Abraham et al.* [1].

Nachdem somit die Relevanz der kombinierten Bestrahlung für humane Zellen im Gewebeverbund im Zuge dieser Arbeit eindeutig bewiesen wurde, sollte der Einfluss dieser Kombination in jedem Fall weiter untersucht werden, um sowohl das Risiko für gesundes Gewebe als auch die Chance zur schnelleren Tumorbekämpfung genauer charakterisieren zu können.

Hierfür bieten sich FTSM an, die um die übrigen Zelltypen, wie Melanozyten und Langerhans-Zellen, erweitert werden, um auch deren Reaktion in das Zusammenspiel der zellulären Antwort auf eine Behandlung zu integrieren. Auch die Bestrahlung sogenannte Tumorsphäroide könnte im nächsten Schritt zur Klärung dieser Fragen beitragen. Des Weiteren wäre es denkbar, Tumorzellen in FTSM einzubringen und so das Zusammenwirken gesunder sowie maligner Zellen in Folge der Bestrahlung zu beobachten. Sollte sich in diesen Versuchen zeigen, dass die Vorbestrahlung mit NIR auch in erweiterten *in vitro*-Kulturen eine Rolle spielt, sollten sich im Folgenden Bestrahlungsversuche mit Schweinen anschließen, da deren Haut eine sehr ähnliche Morphologie der einzelnen Schichten im Vergleich zum Menschen aufweist und so eine sehr weitreichende Risikoabschätzung möglich wäre [235].

---

### 7.3. Mechanismusaufklärung

Zur Schadensantwort von Zellen nach der Bestrahlung mit ionisierender Strahlung gehören die Induktion eines Proliferationsstopps, die Reparatur der verschiedenen Schäden sowie das Einleiten des Zelltodes bei zu starker Schädigung [58, 67, 68]. Interessanterweise hat die Bestrahlung mit  $360 \text{ kJ/m}^2$  NIR 24 h im Voraus auf jeden dieser strahleninduzierten zellulären Prozesse eine stark modulierende Wirkung [11]. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Zellen durch die Vorbestrahlung in einen anderen molekularen Zustand versetzt werden, der wiederum Einfluss auf die Schadensantwort der Zellen hat.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war deshalb die nähere Charakterisierung der molekularen Mechanismen, die zur Modulation der Stressantwort in den mit NIR vorbestrahlten Zellen führen. Hierzu wurde auf die bereits bekannten Effekte der NIR-Vorbehandlung, wie die verzögerte DSB-Reparatur, das verstärkte Vorkommen *Mitotischer Katastrophen* sowie die Veränderung des Proliferationsverhaltens nach ionisierender Strahlung, zurückgegriffen und in humanen Keratinozyten sowie murinen Fibroblasten Proteine, Moleküle und Gene analysiert, deren Beteiligung an der Entstehung solcher Effekten in der Literatur bereits beschrieben wurde.

#### 7.3.1. Einfluss von NIR auf Faktoren der DNA-Doppelstrangbruchreparatur

Der zeitliche Verlauf der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur hängt von verschiedenen Faktoren, wie der Schadenskomplexität, der Zellzyklusphase sowie der umgebenden Chromatinstruktur ab [81, 82, 99, 101, 102]. All diese Faktoren können entsprechend beeinflussen, wie schnell DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) repariert werden.

Zellen, die 24 h vor einer Röntgenbestrahlung mit nahem Infrarot behandelt wurden, zeigen sowohl im Monolayer als auch im Gewebeverbund eine verzögerte DSB-Reparatur. In der Monolayerzellkultur ist diese nach 24 h aufgehoben, sowohl Fibroblasten als auch Keratinozyten in kombiniert bestrahlten FTSM zeigen jedoch auch zu diesem späten Zeitpunkt nach wie vor einen Reparaturdefekt.

In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass der zeitliche Verlauf der DSB-Reparatur vornehmlich durch den Status des umgebenden Chromatins bestimmt wird. DSBs im Euchromatin werden innerhalb der ersten 4 h nach ihrer Entstehung nahezu vollständig beseitigt, Brüche im Heterochromatin hingegen werden mit deutlich langsamerer Kinetik repariert [99]. Tatsächlich wird durch die NIR-Bestrahlung mit  $360 \text{ kJ/m}^2$  zum Zeitpunkt der anschließenden Röntgenbestrahlung ein leicht erhöhtes Level an H3K9me3 induziert. Diese Histonmodifikation ist nur in heterochromatischen DNA-Bereichen nachweisbar, woraus sich schließen lässt, dass durch die Bestrahlung mit NIR der Heterochromatinanteil der Zellen leicht erhöht wird [100]. Ein größerer Anteil heterochromatischer DNA würde wiederum die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung eines heterochromatischen DSBs

---

durch die anschließende Bestrahlung mit Röntgenstrahlen steigern und so zu mehr Brüchen führen, die nur langsam repariert werden. Da nach 4 h die meisten Brüche im Euchromatin repariert sein sollten, könnte die beobachtete Verzögerung zu diesem Zeitpunkt über eine erhöhte Anzahl heterochromatischer Brüche erklärt werden. Für diese Theorie spricht auch die Beobachtung der länger anhaltenden Reparaturverzögerung im FTSM. Zellen im Gewebeverbund weisen durch eine vorangeschrittene Differenzierung vermehrt HC-Bereiche auf, wodurch bei der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen deutlich mehr Brüche in heterochromatischen DNA-Bereichen entstehen [216], was, verglichen mit Zellen im Monolayer, eine wesentlich längere Reparaturzeit zur Folge hat [209, 210, 212]. Dass sich der Effekt der kombinierten Bestrahlung in den gewebetypisch kultivierten Zellen auch nach 24 h noch nicht nivelliert hat, weist eindeutig darauf hin, dass es durch die Vorbestrahlung tatsächlich zu einer größeren Anzahl Brüche kommt, die nur mit langsamer Kinetik repariert werden können und somit wahrscheinlich im Heterochromatin lokalisiert sind.

Auch die Untersuchung des H3K9me3-Levels nach der kombinierten Bestrahlung bestätigt einen Einfluss der NIR-Bestrahlung auf den Chromatinstatus. Anders als der durch die reine NIR-Bestrahlung hervorgerufene Anstieg von H3K9me3 erwarten ließ, führt die NIR-Vorbestrahlung mit nachfolgend applizierter Röntgenbestrahlung jedoch zu einem signifikant geringeren Anteil trimethylierten H3K9s. Diese Herunterregulation des Heterochromatinmarkers zeigt sich in den nur mit 4 Gy bestrahlten Zellen zwar ebenfalls, aber erst 24 h später. Zu diesem Zeitpunkt haben die kombiniert bestrahlten Zellen nahezu das Kontrollniveau wieder erreicht.

Zur Reparatur von Brüchen im Heterochromatin muss die DNA-Struktur rund um den Bruch aufgeweicht werden, um so die Schadensstelle für die Reparaturfaktoren zugänglich zu machen. Diese Öffnung des Heterochromatins in Folge eines DSBs wird durch die ATM vermittelte Phosphorylierung des Proteins KAP1 an Ser824 realisiert [12-14]. Bisher geht die strahlenbiologische Forschung zwar davon aus, dass die Phosphorylierung von KAP1 in Folge ionisierender Strahlung eine lokale Relaxation des HCs induziert, diese Aufweichung aber keine Veränderung der Trimethylierung von Histon H3 zur Folge hat [236]. Die hier erbrachten Ergebnisse würden der zugrundeliegenden Studie von *Goodarzi et al.* somit erst einmal widersprechen. Die Diskrepanz zwischen Literatur und dieser Arbeit lässt sich jedoch vermutlich über den jeweiligen Versuchsaufbau erklären. In der hier zitierten Studie wurde der Methylierungsstatus des Histons H3 8 h nach der Bestrahlung mit 80 Gy in konfluenten primären Fibroblasten untersucht [236]. Im Zuge dieser Arbeit wurde hingegen mit subkonfluenten immortalisierten Zellen und einer wesentlich geringeren Röntgendosis gearbeitet. Des Weiteren wurde der Einfluss der ionisierenden Strahlung auf den HC-Marker zu einem sehr viel späteren Zeitpunkt untersucht. Diese Unterschiede im experimentellen Ablauf könnten so zu einem anderen Ergebnis führen, als bisher publiziert. Eine Studie von *Tjeertes et al.*, in der die Acetylierung verschiedener Lysine des Histons H3 nach ionisierender Strahlung untersucht wurde, bestätigt zudem,

---

dass eine solche Bestrahlung durchaus einen Einfluss auf posttranslationale Modifikationen dieses Histons haben kann [237]. *Ayrapetov et al.* zeigen außerdem, dass es rund um einen durch Laserbestrahlung induzierten DSB zu einer Veränderung des Methylierungszustandes von H3K9 kommt. Dies stützt zusätzlich die hier aufgestellte These, dass auch röntgeninduzierte DSBs zu einer Modifikation der Methylierung dieses Histons führen können [238].

Dass die durch NIR und ionisierende Strahlung hervorgerufenen Effekte tatsächlich die posttranslationale Modifikation des Histons betreffen, konnte durch den Nachweis des Histons im Western Blot klar gezeigt werden. Keine der Bestrahlungsmodalitäten hatte einen Einfluss auf die Expression von Histon H3. Aus diesen Ergebnissen lässt sich somit schließen, dass sowohl die Kombination als auch die ausschließliche Bestrahlung mit 4 Gy tatsächlich einen Einfluss auf den Anteil heterochromatischer DNA hat.

Wie bereits erwähnt, wird die Aufweichung des Heterochromatins rund um einen dort lokalisierten DSB durch die Phosphorylierung von KAP1 eingeleitet [12-14]. Deshalb wurde der Einfluss von NIR auf die Phosphorylierung dieses Proteins mittels Western Blot näher untersucht. Korrespondierend zum Nachweis der verringerten H3K9-Trimethylierung ließ sich hierbei ein erhöhtes Level an pKAP1 in den kombiniert bestrahlten Zellen zeigen. Interessanterweise zeigte sich sowohl die erhöhte Phosphorylierung des Proteins KAP1 als auch das niedrigere Level an H3K9me3 schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach der Bestrahlung, was eher für eine beschleunigte Reparatur heterochromatischer Brüche sprechen würde, als die Verzögerung der Reparatur zu erklären. Da jedoch die Kinetik der Reparatur von HC-DSB nicht alleine durch die nötige Aufweichung, sondern auch durch langsame Reparaturvorgänge wie die HR und einen alternativen NHEJ-Weg zustande kommt [99, 103], weist der erhöhte Bedarf an phosphoryliertem KAP1 vielmehr auf eine größere Anzahl heterochromatischer DSBs hin. Da ATM das Protein ist, das hauptsächlich für die Phosphorylierung von KAP1 verantwortlich ist, war in diesem Zusammenhang auch die Wirkung von NIR in Kombination mit 4 Gy auf den Phosphorylierungsstatus der PIKK-Kinase ATM von großem Interesse. Durch die Bestrahlung mit 4 Gy kommt es zu einer erhöhten Phosphorylierung von ATM an Serin 1981 und so zu einer Aktivierung der Kinase durch die Dissoziation zweier inaktiver Monomere [71, 72]. Anders als das erhöhte pKAP1-Level erwarten ließ, war das Level an phosphoryliertem ATM in den kombiniert bestrahlten Zellen deutlich niedriger als in den ausschließlich mit Röntgenstrahlen bestrahlten. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass durch die NIR-induzierte Veränderung des Chromatins nicht ATM hauptsächlich für die Phosphorylierung von KAP1 verantwortlich ist, sondern eine der beiden anderen PIKK-Kinasen diese Aufgabe übernimmt. So zeigten *White et al.* 2006, dass nach ionisierender Strahlung bei Inhibition von ATM sowohl ATR als auch DNA-PK dazu in der Lage sind, die für die DSB-Reparatur wichtige Phosphorylierung von KAP1 durchzuführen [239]. Für die Annahme, dass die hier postulierte Kompensation von ATM durch ATR und DNA-PK mit der

---

NIR-induzierte Veränderung des Chromatins, explizit H3K9, in röntgenbestrahlten Zellen korreliert, spricht wiederum, dass in der Literatur von einem Zusammenhang zwischen dem Verlust von H3K9me3 und der fehlerhaften Aktivierung von ATM ausgegangen wird [238].

Der Einfluss der NIR-Vorbestrahlung auf die Aktivierung von ATM nach Röntgenstrahlung ist aber noch aus einem anderem Grund interessant: ATM ist eines der Schlüsselproteine der DNA-Schadensantwort. Neben seiner Funktion in der Reparatur heterochromatischer Brüche ist es auch für die Induktion von Zellzyklusarresten nach ionisierender Strahlung verantwortlich [12, 58, 75]. NIR in Kombination mit Röntgenstrahlung hat ein Aussetzen des sonst üblichen Proliferationsstopps nach ionisierender Strahlung sowie einen Anstieg der *Mitotischen Katastrophe* zur Folge [11]. Sollte sich in weiteren Untersuchungen zeigen, dass NIR tatsächlich einen Einfluss auf die ATM-Kinaseaktivität auch zu späteren Zeitpunkten hat, könnte dies auch ein Erklärungsansatz für diese NIR-induzierten Phänomene sein.

Ein weiteres Protein der DNA-Schadensantwort, das durch die Bestrahlung mit NIR maßgeblich beeinflusst wird, ist PARP-1. In einer dieser Arbeit vorangegangenen Studie konnte bereits gezeigt werden, dass 24 h nach der Bestrahlung mit 360 kJ/m<sup>2</sup> NIR ein Anstieg der mRNA dieses Proteins induziert wird [199]. Mit Hilfe von PARP-1 Western Blot-Analysen konnte hier bestätigt werden, dass das erhöhte Vorkommen der mRNA sich auch auf Proteinebene widerspiegelt. Die Bestrahlung mit ionisierender Strahlung hat nach 15 min ebenfalls einen deutlichen Anstieg der Proteinmenge zur Folge, der in den kombiniert bestrahlten Zellen, trotz des eigentlich erhöhten Levels durch die Vorbestrahlung, überraschenderweise ausbleibt. 8 h nach der Röntgenbestrahlung dreht sich dieses Verhältnis jedoch deutlich um.

Wie es genau zu der Wirkung von NIR auf PARP-1 kommt, konnte bisher nicht geklärt werden. Da es bereits durch die ausschließliche Bestrahlung mit NIR zu einer Wirkung auf mRNA-Ebene kommt, wäre es durchaus denkbar, dass die kombinierte Bestrahlung ebenfalls einen Einfluss auf die Expression des für PARP-1 kodierenden Gens hat. Des Weiteren wäre es möglich, dass die RNA auf Grund der Vorgänge in den kombiniert bestrahlten Zellen direkt nach der Röntgenbestrahlung nicht in Protein translatiert werden kann. Ein genereller Einfluss von NIR und Röntgenstrahlung auf die Proteinsynthese zeigte sich bei der Untersuchung der phosphorylierten Form des translationskontrollierenden Proteins eIF2 $\alpha$  mit Hilfe des PathScan-ELISAs zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung [149]. Dieser Einfluss der beiden Strahlenarten lässt es durchaus möglich erscheinen, dass es über diesen Weg zu einer verminderten Proteinmenge von PARP-1 direkt nach der kombinierten Bestrahlung kommt.

In einer Studie von *Aguilar-Quesada et al.* konnte eine Interaktion zwischen PARP-1 und ATM nachgewiesen werden, welche die korrekte Aktivierung von ATM nach ionisierender Strahlung



---

gewährleistet [116]. Das durch die NIR-Vorbestrahlung verminderte PARP-1-Level könnte somit das geringere Level an pATM in den kombiniert bestrahlten Zellen erklären. Die daraus resultierende verminderte Aktivierung von ATM würde sich wiederum in einer gestörten Strahlenantwort der Zellen äußern.

Neben der Interaktion zwischen PARP-1 und ATM im Zuge der DNA-Schadensantwort spielt PARP-1 jedoch auch direkt bei der Reparatur von DNA-Schäden eine wichtige Rolle. Als Sensor für *nick-ends* ist dieses Protein essenziell bei der Reparatur von Einzelstrangbrüchen [114]. Nach der Erkennung eines Einzelstrangbruchs kommt es zur Automodifikation des Proteins, was für die Rekrutierung der Reparaturproteine des „*Base excision repair*“-Signalweges (BER) XRCC1 und Polymerase  $\beta$  an den Schaden erforderlich ist [57, 115]. Durch die Bestrahlung mit ionisierender Strahlung werden pro 1 Gy ca. 1.000-2.000 Basenschäden, 500-1.000 Einzelstrangbrüchen sowie 200-300 alkalilabilen Stellen induziert [55]. All diese Schäden werden üblicherweise sehr schnell durch die BER repariert, weshalb sie im Vergleich zu DSBs zu den weniger schwerwiegenden Ereignissen nach ionisierender Strahlung zählen. Fehlt Zellen in der G1-Phase jedoch PARP-1, kommt es zu einer deutlichen Verzögerung der Reparatur von Einzelstrangbrüchen [240]. Durch das reduzierte PARP-1-Level in den kombiniert bestrahlten Zellen ist es daher sehr wahrscheinlich, dass es zu einer Störung der Einzelstrangbruchreparatur kommt. Liegen solche unreparierten Einzelstrangbrüche auf gegenüberliegenden Strängen zu nah bei einander, können durch Aufbrechen der DNA aus diesen einfachen Schäden deutlich schwerwiegendere Doppelstrangbrüchen entstehen [241]. Durch die Reduktion von PARP-1 in den kombiniert bestrahlten Zellen ist die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von DSBs aus Einzelstrangbrüchen potentiell erhöht, was zu einer größeren Anzahl DSBs in diesen Zellen führen könnte. Zusätzlich begünstigt werden könnte dieser Weg der Entstehung von DSBs aus Einzelstrangbrüchen auch durch die, durch NIR-Vorbestrahlung bis zu 3 h nach Röntgenbestrahlung erhöhte Induktion *Reaktiver Sauerstoffspezies* [11]. Abgesehen davon, dass so die Anzahl von klassischen DSBs in den kombiniert bestrahlten Zellen erhöht wäre, könnte es auch zur Entstehung sogenannter komplexer Schäden kommen. Definitionsgemäß entstehen solche komplexen Schäden aus einer Vielzahl verschiedener DNA-Schäden in direkter räumlicher Nähe. Solche Schadensstellen werden nach der Bestrahlung mit schweren Ionen häufig beobachtet, bei der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen treten sie erst bei vergleichsweise hohen Dosen auf. Sollte durch die Vorbestrahlung mit NIR die Reparatur von Einzelstrangbrüchen gestört sein, ist es aber möglich, dass durch das Aufeinandertreffen von DSBs und unreparierten Einzelstrangbrüchen solche Schadenscluster entstehen. Die Reparatur solcher komplexer Schäden verläuft deutlich langsamer, als das bei den durch Röntgenstrahlung üblicherweise verursachten DSBs der Fall ist [81]. Dies könnte weiterhin erklären, warum in den kombiniert bestrahlten FTSM auch 24 h nach der Röntgenbestrahlung noch eine signifikant erhöhte Anzahl DSBs vorhanden ist.

---

Im Zuge der DNA-Schadensantwort ist PARP-1 jedoch nicht nur an der Reparatur von Einzelstrangbrüchen, sondern auch an der von DSBs beteiligt. Eine der Hauptaufgaben des Proteins ist die Poly(ADP-ribosyl)ierung verschiedener Histonvarianten zu Beginn der Reparaturvorgänge [109]. Da die Vorbestrahlung mit NIR einen signifikanten Einfluss auf den Chromatinstatus röntgenbestrahlter Zellen sowohl zu 4 h als auch zu 24 h hat, wäre es nicht ausgeschlossen, dass auch der Einfluss von PARP-1 hier mit hineinspielt.

Eine weitere wichtige Funktion von PARP-1 im Zuge der DSB-Reparatur ist die Rekrutierung von XRCC1 sowie DNA-Ligase III im sogenannten *back-up* NHEJ (B-NHEJ) [118, 119]. Bei diesem Signalweg handelt es sich um einen stark fehleranfälligen alternativen NHEJ-Weg, der im Falle einer Störung wichtiger Schlüsselproteine, wie Ku70/Ku80 oder auch der DNA-PK, aktiviert wird [117, 118]. Zwar ist davon auszugehen, dass bei den hier verwendeten Zellen alle wichtigen Faktoren des NHEJs vorhanden sind, jedoch könnte die Vorbestrahlung mit NIR eventuell einen Einfluss auf die Funktionalität dieser Proteine haben. Wäre dies der Fall, könnte der Anstieg der Expression von PARP-1 8 h nach der kombinierten Bestrahlung durchaus über die Aktivierung dieses Signalweges erklärt werden. Wäre es erforderlich, die verbliebenen DSBs über B-NHEJ zu reparieren, würde mehr PARP-1 in diesen Zellen benötigt. Auch könnte die Reparaturkinetik dieses alternativen Weges die Persistenz von DSBs nach kombinierter Bestrahlung erklären.

Auf welchen dieser Prozesse die PARP-1 Reduktion direkt nach der Röntgenbestrahlung schlussendlich störend wirkt, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Ein möglicher Weg zur Untersuchung dieser Fragestellung wäre der Nachweis der Lokalisation von PAR-Ketten oder auch die Untersuchung einzelner Faktoren der Einzelstrangbruchreparatur sowie des B-NHEJs und des regulären NHEJs. Außerdem sollte geklärt werden, ob der durch NIR-Vorbestrahlung induzierten Reduktion bzw. Hochregulation von PARP-1 möglicherweise die jeweils angepasste Expression des Gegenspielers PARG entgegenwirkt [105].

Zwar kann hier abschließend nicht die eine Ursache für die verzögerte DSB-Reparatur gefunden werden, jedoch konnte im Zuge dieser Arbeit erstmals deutlich gezeigt werden, dass NIR einen Einfluss auf verschiedene Faktoren der DNA-Schadensantwort hat. Um abschließend sagen zu können, wie es zu der Verzögerung kommt, können nun mit Hilfe dieser Daten konkrete Fragestellungen, wie die tatsächliche Lokalisation der persistenten DSBs im Chromatin, der Einfluss von NIR auf die Entstehung und Reparatur von Einzelstrangbrüchen, sowie die Rolle von PARP-1 bearbeitet werden.



---

### 7.3.2. Einfluss von NIR auf die Entstehung röntgeninduzierter *Mitotischer Katastrophen*

Heselić et al. zeigten 2012, dass die Vorbestrahlung mit  $360 \text{ kJ/m}^2$  NIR zu einer signifikant erhöhten Zahl röntgeninduzierter *Mitotischer Katastrophen* (MC) führt. Als Ursache für diesen Effekt könnte hierbei das Auftreten der verzögerten DSB-Reparatur nach NIR- und Röntgenstrahlung gesehen werden. Gegen diese Annahme sprach jedoch, dass die Reparaturverzögerung in der Monolayerzellkultur nach 24 h wieder aufgehoben, die erhöhte Anzahl an MCs aber auch nach 72 h noch nachweisbar war [11, 199]. Dies führte zu der Annahme, dass die Bestrahlung mit NIR darüber hinaus auf noch unbekannte Weise die Mechanismen der Zellzykluskontrolle nach Röntgenstrahlung beeinflussen muss. Im Zuge dieser Arbeit konnte, wie bereits beschrieben, eine inhibitorische Wirkung der NIR-Vorbestrahlung auf die Phosphorylierung der ATM-Kinase gezeigt werden. Dieser Effekt könnte durchaus zu Störungen im Verlauf der üblicherweise nach der Bestrahlung mit ionisierender Strahlung einsetzenden Zellzyklusarreste führen. Da jedoch von Heselić et al. kein signifikanter Einfluss auf die Zellzyklusverteilung kombiniert bestrahlter Zellen gezeigt werden konnte, kann die Wirkung der NIR-Vorbestrahlung auf pATM nicht alleine für den gravierenden Effekt der erhöhten Anzahl an MCs verantwortlich sein [11, 199]. Nachdem somit ausgeschlossen werden kann, dass dieser langfristige NIR-Effekt durch die verzögerte DSB-Reparatur oder das fehlerhafte Wirken von röntgeninduzierten Checkpoints verursacht wird, lag es nah, dass es stattdessen zu Fehlern im Verlauf der Mitose kommt, die sich über die Zeit in der Entstehung einer erhöhten Anzahl *Mitotischer Katastrophen* manifestieren. Zu dieser Theorie passt die durch NIR-Vorbestrahlung signifikant veränderte *foxm1*-Expression röntgenbestrahlter Zellen zu 4 h und 24 h nach ionisierender Strahlung. Weder NIR noch Röntgenstrahlung alleine haben einen Einfluss auf die Expression von *foxm1*. Durch die kombinierte Bestrahlung kommt es jedoch interessanterweise in den ersten 4 h nach der Röntgenbestrahlung erst einmal zu einem Anstieg der *foxm1*-Expression, nach 24 h dreht sich dieser Effekt jedoch signifikant um und führt so, verglichen mit den ausschließlich mit 4 Gy bestrahlten Zellen, zu einer fast 50%igen Reduktion.

Zwar übernimmt der Transkriptionsfaktor FOXM1 in allen Phasen des Zellzykluses wichtige regulatorische Funktionen, speziell während der Mitose ist FOXM1 aber sowohl für die akkurate Progression als auch für die Integrität des Spindelapparates essenziell [124, 125, 131-133]. Verschiedenen Studien zeigen, dass sowohl eine Hoch- als auch eine Herunterregulation von FOXM1 zu der Entstehung genomischer Instabilität durch Störung der Vorgänge in der Mitose führen kann. So zeigen Teh et al., dass es durch eine exogene Hochregulation von FOXM1 über retrovirale Transduktion zu einem erhöhten Verlust der Heterozygotie (LOH) sowie einem erhöhten Vorkommen sogenannten „copy number variation“ (CNV) kommt [144]. Im Gegenzug wiesen Wonsey et al. nach, dass Zellen trotz fehlendem FOXM1 zwar in die Mitose eintreten, aber auf Grund von Aberrationen des

---

Spindelapparates nicht fähig sind, diese Zellzyklusphase vollständig abzuschließen, was zu polyploiden Zellkernen führte [129]. Die Beobachtung der erhöhten genomischen Instabilität durch fehlendes FOXM1 wird des Weiteren von *Laoukili et al.* bestätigt, die in ihrer Studie durch die Herunterregulation des Transkriptionsfaktors Fehler in der Chromosomensegregation sowie im Prozess der Zytokinese nachweisen konnten [133].

Aus den hier erbrachten Ergebnissen der NIR-Vorbestrahlung auf die mRNA des Transkriptionsfaktors lässt sich nicht schließen, welche Wirkung sich auf Proteinebene widerspiegelt. Da jedoch sowohl eine Hoch- als auch eine Herunterregulation mit der Entstehung genomischer Instabilität in Verbindung gebracht werden kann, ist es sehr wahrscheinlich, dass das durch die NIR-Vorbestrahlung verursachte Ungleichgewicht in der Expression von *foxm1* mit dem erhöhten Auftreten der *Mitotischen Katastrophe* zusammenhängt. Dass es durch NIR-Vorbestrahlung jedoch wahrscheinlicher zu einer Herunterregulation kommt, zeigt sich bei der Expressionsanalyse verschiedener Gene, die unter der Kontrolle von FOXM1 stehen. In den kombiniert bestrahlten Zellen kam es 24 h nach der Röntgenbestrahlung zu einer deutlichen Hemmung der Transkription von *auroraB*, *nek2*, *plk1*, *cenpA*, *cenpB* sowie *xrcc1*. Der Einfluss von FOXM1 auf die Vorgänge des Zellzykluses ist eher indirekt durch die Aktivierung der Expression bestimmter Gene zu bestimmten Phasen im Zellzyklus. Interessanterweise haben die meisten Proteine, deren Transkription in den kombiniert bestrahlten Zellen gehemmt ist, wichtige Aufgaben beim Erhalt der Integrität des Spindelapparates sowie des Spindelcheckpoints und werden mit der Entstehung *Mitotischer Katastrophen* in Verbindung gebracht [125, 129, 137-139, 201]. Besonders stark ausgeprägt ist die Wirkung der NIR-Vorbestrahlung auf die Expression von *cenpA* und *cenpB* nach Röntgenbestrahlung. In den kombiniert bestrahlten Zellen kommt es hierbei zu einer fast vollständigen Reduktion des *cenpB*-Transkripts. Das Produkt dieses Gens ist während des gesamten Zellzykluses im centromerischen und pericentromerischen Heterochromatin lokalisiert, wo es an bestimmte  $\alpha$ -Satellitsequenzen, sogenannte CENP-B-Boxen, bindet [134, 242]. In diesen DNA-Bereichen liegt es in direkter Nähe zu CENP-A, der centromerischen Histon H3-Variante [242]. Beide Proteine zusammen findet man während der Mitose im inneren Teil des Kinetochors, der Plattform für den Mikrotubuli bindenden äußeren Teil des Zentromers [134]. Bisher ist die Funktion von CENP-B im Kinetochor zwar noch nicht eindeutig geklärt, das Vorkommen des Proteins im Zentromer lässt aber den Schluss zu, dass es während der Mitose an der korrekten Bildung des Kinetochors im Zuge der Chromosomensegregation beteiligt sein könnte [243]. Untersuchungen von *cenpB*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäusen führten zu dem Schluss, dass durch die Inhibition dieses Proteins keine Störungen im Verlauf der Mitose zu finden sind, da die Aufgabe des Proteins wahrscheinlich durch andere Proteine übernommen werden kann [244, 245]. CENP-A<sup>-/-</sup>-Mäuse hingegen versterben pränatal und ihre Zellen weisen Mikronuklei, Makronuklei, nucleäres *Bridging* und *Blebbing*,

---

Chromatinfragmente sowie hyperkondensierte DNA-Bereichen auf, was auf starke Störungen der Mitose schließen lässt. Des Weiteren zeigt sich durch das Fehlen von CENP-A eine diffuse Verteilung von CENP-B in den Zellkernen dieser Mäuse, weshalb eine direkte Beziehung zwischen diesen beiden zentromerbildenden Proteinen im Zusammenhang mit der Mitose angenommen werden kann [246]. Da in den NIR-vorbestrahlten Zellen sowohl die mRNA von *cenp-B* als auch die von *cenp-A* herunterreguliert ist, könnte es durch das vereinte Fehlen dieser beiden Kinetochorkomponenten möglicherweise zu Defekten in der Bildung des für die Segregation der Chromosomen essenziellen Kinetochorkomplexes kommen. Durch eine solche Fehlbildung wäre es möglich, dass die Bindung des Spindelapparates mit den Chromosomen fehlschlägt, wodurch die korrekte Teilung der beiden Schwesterchromatiden nicht stattfinden kann, was wiederum zur Ausbildung *Mitotischer Katastrophen* führen würde. Zwar konnte ein Einfluss der NIR-Vorbestrahlung auf CENP-B mittels Western Blot-Analyse zu 24 h nach der Röntgenbestrahlung nicht bestätigt werden, da dieses Protein jedoch zellzyklusphasenabhängig neu gebildet werden muss [247], wäre es möglich, dass sich das Fehlen der mRNA erst zu einem späteren Zeitpunkt auf Proteinebene manifestiert. Sollte die Reduktion der beiden CENP-Proteine durch die NIR-Vorbestrahlung tatsächlich zu Störung der Bildung des Kinetochors führen, wäre dieser Defekt somit vor allem für die später auftretenden *Mitotischen Katastrophen* verantwortlich.

Weiterhin wäre denkbar, dass durch den Effekt von NIR auf *cenp-b* nicht die Bildung des Kinetochors direkt zu der Entstehung *Mitotischer Katastrophen* führt, sondern dies Einfluss auf die Progression der Mitose nach ionisierender Strahlung hat. So konnte gezeigt werden, dass durch PARP-1 in Folge von DNA-Schäden verschiedene zentromerbildende Proteine, wie CENP-A und B, PARyliert werden, was von den Forschern als Teil des Spindelcheckpoints gesehen wird [248]. Da im Zuge dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Vorbestrahlung mit NIR zu frühen Zeitpunkten nach der ionisierenden Bestrahlung die Expression von PARP-1 beeinflusst, wäre ein solcher Zusammenhang somit ebenfalls vorstellbar.

Durch den Einfluss von NIR auf *nek2*, *plk1* und *auroraB* wäre es des Weiteren nicht ausgeschlossen, dass es in den kombiniert bestrahlten Zellen zur Entstehung multipler Spindeln kommt, was ebenfalls zu der Morphologie der *Mitotischen Katastrophe* führen kann [201, 249]. Auch wäre es gut möglich, dass in der Gesamtzellpopulation eine Kombination all dieser Konsequenzen für die schwerwiegenden Folgen der NIR-Vorbestrahlung verantwortlich ist.

Im Zuge dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass die Bestrahlung mit 360 kJ/m<sup>2</sup> NIR 24 h vor einer Röntgenbestrahlung einen signifikanten Einfluss auf die Expression verschiedener Gene des FOXM1-Signalweges hat, wodurch sich möglicherweise die gesteigerte Anzahl *Mitotischer Katastrophen* nach dieser kombinierten Bestrahlung erklären lässt. Weitere Analysen des Signalweges nach der

---

kombinierten Bestrahlung wären somit von großer medizinischer Relevanz, da in den letzten Jahren immer deutlicher wurde, dass der Transkriptionsfaktor FOXM1 in vielen Tumorzellen hochreguliert ist [128-130]. Würde die Kombination aus NIR und Röntgenstrahlung tatsächlich zu einer Hemmung dieses Proteins führen, könnte durch eine ebensolche Kombination eine zusätzlich schädigende Wirkung ionisierender Strahlung bei diesen Tumoren erzielt werden, was möglicherweise zu einem schnelleren Therapieerfolg bei niedrigerer Strahlenbelastung führen würde.

### 7.3.3. NIR hat Einfluss auf den zellulären Metabolismus

Verschiedene Studien beschreiben, dass die Bestrahlung mit Wellenlängen des nahen Infrarots (NIR) Einfluss auf den zellulären Metabolismus hat. Hauptgrund hierfür ist die Absorption der Wellenlängen durch die *Cytochrom-C-Oxidase* und die daraus resultierende Steigerung der Atmungskettenaktivität. Durch diese NIR-induzierte Anregung metabolischer Prozesse kommt es sowohl zu einer erhöhten ATP-Syntheserate als auch zu einer Steigerung der intrazellulären ROS-Konzentration [38, 39, 250]. Des Weiteren wurde der Einfluss von NIR auf die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  sowie den cAMP-Metabolismus beschrieben [43-46, 251]. Sowohl ROS als auch  $\text{Ca}^{2+}$  und cAMP fungieren konzentrations- und ortsabhängig als sekundäre Botenstoffe und aktivieren oder hemmen so eine Vielzahl von Signalwegen [166, 168, 171, 175, 177, 194], wodurch sich die Wirkung naher Infrarotstrahlung sehr gut erklären lässt [38, 252, 253]. Zellen, die mit NIR vorbestrahlt wurden, wären somit in einem anderen metabolischen Zustand, als die der unbestrahlten Kontrolle, was die Schadensantwort stark modulieren könnte. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Parameter des Zellmetabolismus nach NIR und Röntgenbestrahlung untersucht.

In vorangegangenen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass auch durch eine NIR-Bestrahlung mit  $360 \text{ kJ/m}^2$  die intrazelluläre ROS-Konzentration bis zu 24 h erhöht ist und eine Vorbestrahlung mit dieser NIR-Dosis zu einem mehr als additiven ROS-Anstieg nach ionisierender Strahlung führt [11, 34]. Im Zuge dieser Arbeit konnte wiederum gezeigt werden, dass dieser durch NIR verursachte zusätzliche Anstieg der *Reaktiven Sauerstoffspezies* keinen Effekt auf die Aktivität der *Superoxid Dismutase* hat. Weder in den ausschließlich mit NIR bestrahlten Zellen noch in den kombiniert bestrahlten Zellen kam es zu einer veränderten Aktivität dieses antioxidativen Enzyms. Daraus lässt sich schließen, dass die erhöhte ROS-Konzentration durch NIR nicht durch eine NIR-induzierte Störung dieses Proteins zu Stande kommt. Sollten nicht andere neutralisierende Proteine, wie beispielsweise Katalasen oder Glutathion durch die NIR-Vorbestrahlung signifikant hochreguliert werden, kann somit davon ausgegangen werden, dass das erhöhte ROS-Level in diesen Zellen wirken kann und die Signalwirkung der zusätzlichen ROS nicht durch das *Antioxidative System* der Zellen terminiert wird. Für diese Annahme spricht auch, dass sich im Zuge der PathScan-Analyse

---

als einziges signifikant durch die NIR-Vorbestrahlung beeinflusstes Protein das redox-sensitive I $\kappa$ B $\alpha$  nachweisen ließ. Dieses Protein liegt im Zytoplasma in einem Komplex mit dem Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B vor und inhibiert so dessen Transkriptionsaktivität. Durch die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  wird diese Verbindung gelöst, NF $\kappa$ B kann in den Kern translozieren und dort als Transkriptionsfaktor wirken [15, 16]. Die kombinierte Bestrahlung mit NIR und Röntgenstrahlung induziert einen signifikanten Anstieg dieser NF $\kappa$ B-freisetzenden Phosphorylierung. *Huang et al.* beschreiben in ihrem Review zur Wirkung von LLLT (Low Level Laser (Licht) Therapie), dass durch die erhöhte Induktion *Reaktiver Sauerstoffspezies* nach der Bestrahlung mit Wellenlängen des NIR-Spektrums das Protein PDK (*Proteinkinase D*) aktiviert wird, was im Folgenden wiederum zur Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  und so zur Transkription NF $\kappa$ B-abhängiger Gene führt [252]. Ein ähnlicher Wirkmechanismus wäre auch für das durch die kombinierte Bestrahlung erhöhte ROS-Level denkbar. Die fehlerhafte Aktivierung von NF $\kappa$ B durch NIR-Vorbestrahlung würde somit dazu führen, dass die Genexpression nach ionisierender Strahlung verändert wäre, was wiederum die veränderte Schadensantwort der kombiniert bestrahlten Zellen erklären würde. Zwar muss diese Annahme durch die direkte Untersuchung von NF $\kappa$ B noch näher verifiziert werden, dass aber auch das Proteinlevel an I $\kappa$ B $\alpha$  nach der kombinierten Bestrahlung signifikant gesteigert ist, kann hier durchaus als weiterer Beleg für die NF $\kappa$ B-Aktivierung gesehen werden, da die Transkription des Inhibitors selbst unter der Kontrolle von NF $\kappa$ B steht [254].

Wie bereits erwähnt, gibt es eine Vielzahl Publikationen, die die Wirkung von NIR mit dem intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegel sowie dem intrazellulären cAMP-Level in Zusammenhang bringen [45, 46]. Im Zuge dieser Arbeit konnte auf keinen dieser beiden zellulären Parameter ein signifikanter Einfluss der NIR-Bestrahlung gefunden werden. Zwar kommt es direkt nach NIR zu einem leichten Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration sowohl in HaCaT- als auch in NIH/3T3-Zellen, dieser fiel jedoch so gering aus, dass er wohl nicht ausschlaggebend für die durch NIR-Vorbestrahlung doch sehr deutlichen Effekte der gestörten Schadensantwort sein kann. Ebenfalls gegen den Einfluss von cAMP auf diese Effekte spricht, dass die Reaktion der beiden hier untersuchten Zelllinien nach der kombinierten Bestrahlung sehr unterschiedlich ausfiel, die Effekte der gestörten Schadensantwort jedoch in beiden Zelllinien ähnlich zu beobachten sind [11].

Auch die Untersuchung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Levels nach kombinierter Bestrahlung zeigt keinen signifikanten Einfluss der NIR-Vorbestrahlung. Interessant ist hierbei jedoch, dass durch die Kombination aus NIR und Röntgenbestrahlung im Durchschnitt jeweils deutlich weniger Ca<sup>2+</sup> detektiert wurde. Bei den hier durchgeführten Messungen wurden vorab die Mitochondrien aus den Zellen isoliert und nur das Ca<sup>2+</sup> im Zytoplasma der Zellen bestimmt. Auf Grund der Aufnahme von überschüssigem Ca<sup>2+</sup> im Anschluss an einen calciuminduzierten Stimulus durch die Mitochondrien kommt es nachweislich zu einem Anstieg der ATP-Produktion und der Konzentration *Reaktiver*

---

*Sauerstoffspezies* [166, 168]. Da bisher noch nicht geklärt werden konnte, wo die durch die NIR-Vorbestrahlung zusätzlich induzierten ROS genau herkommen, wäre es denkbar, dass es durch die Bestrahlung mit Röntgenstrahlung zu einem abrupten Abbruch eines durch NIR induzierten Calciumsignals kommt. Durch diese plötzliche Terminierung könnte freies  $\text{Ca}^{2+}$  in die Mitochondrien gelangen und so zu einer überschüssigen ROS-Produktion führen. Dass zum Zeitpunkt der Röntgenbestrahlung die Calciumkonzentration in den ausschließlich mit NIR bestrahlten Zellen im Durchschnitt erhöht ist, deutet ebenfalls auf ein solches Calciumsignal hin.

Abschließend lässt sich sagen, dass bisher zwar nur ein signifikanter Einfluss auf die Produktion *Reaktiver Sauerstoffspezies* nachgewiesen werden konnte, dieser jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit mit dem Calciumhaushalt der Zellen in Verbindung steht.

#### 7.3.4. Abhängigkeit des NIR-Einflusses von Dosis vs. Expositionsdauer

Die hier untersuchte nahe Infrarotstrahlung (NIR), die auch Teil des natürlichen Sonnenlichts ist, wird im medizinischen Alltag in den unterschiedlichsten Bereichen angewandt. In verschiedenen Patientenstudien konnte bereits eine verbesserte Wundheilung, eine Schmerzreduktion sowie eine verminderte Infektionsrate von Operationswunden nach der Bestrahlung mit Wellenlängen des Infrarotspektrums nachgewiesen werden [4, 5, 255, 256]. Je nach Fragestellung werden einzelne Wellenlängen oder auch das gesamte Spektrum appliziert. Einzelne Wellenlängen finden hierbei vor allem Anwendung in der sogenannten Low Level Laser (Licht) Therapie (LLLT), das gesamte Spektrum wird hingegen im Zuge der wIRA-Therapie eingesetzt. Die Abkürzung wIRA steht bei diesem Therapieansatz für wassergefiltertes Infrarot A. Durch das Vorschalten eines Wasserfilters sowie eines Farbfilters kann das Spektrum eines Halogenstrahlers auf den Infrarot A-Anteil (0,78-1,4 nm) limitiert werden. Durch die beiden vorgeschalteten Filter entspricht das applizierte Wellenlängenspektrum des Strahlers der natürlichen Infrarotexposition auf der Erde. Oft wird dieser Bereich in der medizinischen Anwendung noch durch einen Teil des sichtbaren Rotlichts ergänzt. Distinkte Wellenlängen im Zuge der LLLT werden durch bestimmte Laser oder auch LED-Dioden erzeugt. Interessant bei der Anwendung solcher Therapien ist immer die Frage nach den genauen Applikationsparametern, weshalb in der Phototherapie sowohl die verwendeten Wellenlängen (nm), die Bestrahlungsstärke ( $\text{W}/\text{cm}^2$ ), die Bestrahlungszeit (min) sowie die Bestrahlungsdosis oder auch Energiedichte ( $\text{J}/\text{m}^2$ ) angegeben werden sollten [252]. Weil es durch den Energieeintrag während der Bestrahlung auch zu thermischen Effekten kommen kann, ist des Weiteren die Kontrolle der Temperatur während der gesamten Bestrahlung essentiell, da durch den Anstieg der Gewebetemperatur durchaus andere Wirkungen eintreten können, als bei einer rein athermischen Applikation der Infrarot A-Wellenlängen [54].



---

Die im Zuge dieser Arbeit mit der laboreigenen Bestrahlungsapparatur angewandte Bestrahlungsdosis von  $360 \text{ kJ/m}^2$  wurde mit dem Wellenlängenspektrum 0,6-1,4 nm (NIR), einer Bestrahlungsstärke von  $18 \text{ mW/cm}^2$  über 35 min appliziert. Ein Anstieg der Temperatur konnte in den bestrahlten Kulturen nicht festgestellt werden. Diese Parameter wurden unter den Aspekten der Therapierelevanz, aber auch unter Betrachtung der möglichen Exposition durch das natürliche Sonnenlicht gewählt.

Das von Bunsen und Roscoe aus dem Jahre 1892 stammende gleichnamige Gesetz der Reziprozität von Intensität und Zeit einer Bestrahlung besagt, dass die photochemische bzw. photobiologische Wirkung einer Bestrahlung proportional zur Bestrahlungsdosis, dem Produkt aus diesen beiden Parametern, sei. Hieraus würde somit folgen, dass bei gleicher Bestrahlungsdosis unter Variation von Zeit und Intensität dieselben Bestrahlungseffekte erzielt werden können. Verschiedene experimentelle *in vitro*-Studien widerlegen dieses Gesetz für die Bestrahlung mit Infrarot deutlich [252, 257]. Jedoch gibt es auch Arbeiten, die dieses theoretische Gesetz bestätigen [258]. Aus diesem Widerspruch in der Literatur ergab sich für die hier angewandten Bestrahlungsparameter die Frage, ob die Effekte, die durch eine Vorbestrahlung mit NIR hervorgerufen werden, in Abhängigkeit zur Dosis oder zu der Zeit der Bestrahlung auftreten. Für diese Untersuchung wurde ein wIRA-Strahler der Firma Hydrosun mit einer 750 W Halogenlampe verwendet, dessen Spektrum mit einem Langpassfilter 590 nm auf den NIR-Wellenlängenbereich limitiert wurde. Durch die hohe Leistung des Halogenleuchtmittels kann die Dosis von  $360 \text{ kJ/m}^2$  mit dem Hydrosun<sup>®</sup>-Strahler bei einer Bestrahlungsstärke von  $200 \text{ mW/cm}^2$  innerhalb von 3 min appliziert werden. Verglichen wurden die Proliferationsrate über den BrdU-Einbau sowie das ROS-Level über DCFDA-Fluoreszenz sowohl nach der ausschließlichen Bestrahlung mit wIRA, als auch nach der kombinierten Bestrahlung mit wIRA und einer 24 h später erfolgenden Röntgenbestrahlung.

NIR mit der laboreigenen Apparatur appliziert, führt bereits ab einer Dosis von  $180 \text{ kJ/m}^2$  zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation, die sich stetig bis zu einer Dosis von  $720 \text{ kJ/m}^2$  fortsetzt [199]. Diese Reduktion zeigt sich hier analog auch nach der Bestrahlung mit  $360 \text{ kJ/m}^2$  und  $760 \text{ kJ/m}^2$  wIRA. Der Vergleich zwischen den mit NIR und den mit wIRA bestrahlten Zellen lässt somit eindeutig darauf schließen, dass tatsächlich die Dosis ausschlaggebend für den Effekt der gesenkten Proliferation ist. Verschiedene Studien weisen für die Bestrahlung mit nahem Infrarot, bzw. Wellenlängen des nahen Infrarots eine proliferationsfördernde Wirkung nach [3, 51, 221, 223]. Da jedoch in keiner dieser Untersuchungen mit den hier verwendeten Dosen gearbeitet wurde, stützt dies zusätzlich die Theorie, dass nicht alleine die Wellenlängen für die Wirkung der Bestrahlung in den ersten 24 h verantwortlich sind, sondern vor allem der Energieeintrag in den Zellen Einfluss auf den Zellzyklus nimmt. Hier zu passt auch die Theorie von Huang *et al.*, nach der die Wirkung einer LLLT-Behandlung einer biphasischen Dosiskurve folgt. Ist die Dosis zu niedrig, kann der gewünschte Effekt einer Behandlung nicht erzielt werden. Zur Stimulation von Zellen muss somit erst eine bestimmte

---

Grenzdosis erreicht werden, die ausreicht, zelluläre Prozesse so zu beeinflussen, dass die positive Wirkung einer Bestrahlung, wie beispielsweise die Induktion einer erhöhten Proliferation im Falle der Wundheilung, erreicht werden kann [252, 253]. Auch in dieser Arbeit zeigte sich, diesem Prinzip folgend, ab einer wIRA-Dosis von  $1440 \text{ kJ/m}^2$  ein kontinuierlicher Anstieg der BrdU-Einbaurate, der ab einer Dosis von  $3600 \text{ kJ/m}^2$  erstmals signifikant über dem der unbestrahlten Kontrolle lag. Zu beachten wäre hierbei jedoch, dass bei Applikation von  $1440 \text{ kJ/m}^2$  erstmals auch ein Anstieg der Temperatur des Mediums auf  $40^\circ\text{C}$  zu beobachten war. Durch eine Bestrahlung mit  $3600 \text{ kJ/m}^2$  steigt diese Temperatur sogar auf bis zu  $42^\circ\text{C}$  an. Aus diesem Grund könnte die erhöhte Proliferationsrate ab  $1440 \text{ kJ/m}^2$  nicht allein auf die wIRA-Dosis, sondern möglicherweise auch auf einen thermischen Effekt, zurückzuführen sein [54].

Interessanterweise zeigte sich bei der Messung des ROS-Levels direkt nach  $360 \text{ kJ/m}^2$  wIRA ein signifikanter Anstieg der DCFDA-Fluoreszenz. Dieser Effekt ist ebenfalls vergleichbar mit der Wirkung einer NIR-Bestrahlung bei gleicher Dosis [34]. Die Wirkung der Bestrahlung mit nahem Infrarot wird in der Literatur primär mit der Absorption der Strahlung in den Mitochondrien erklärt [252]. Hauptabsorber des nahen Infrarots ist die in der Mitochondrienmembran lokalisierte *Cytochrom-C-Oxidase*, deren aktives Zentrum durch eine Häm-Gruppe und ein Kupfer-Ion als Chromophor für diese Wellenlängen dient. Durch die Absorption der Wellenlängen kommt es nach einer Bestrahlung mit nahem Infrarot zu einer erhöhten Atmungskettenaktivität und in Folge dessen zu einem Anstieg der ROS-Produktion in den Mitochondrien [36, 37, 39-42]. Auf den ersten Blick wäre es deshalb unwahrscheinlich, dass die Bestrahlung mit unterschiedlichen Zeiten einen so ähnlichen Effekt auf die Mitochondrien hat. *Amat et al.* entwickelten jedoch die Theorie, dass die Wirkung der NIR-Bestrahlung neben der direkten Absorption der Wellenlängen durch Chromophore auch in der Induktion eines elektrischen Feldes resultieren kann [36]. Die elektrische Energie des applizierten Lichts überträgt sich hierbei in den Zellen ungerichtet auf verschiedene Atome oder Moleküle, die kein direktes Chromophor für die NIR-Wellenlängen besitzen. Dieses Licht-induzierte elektrische Feld versetzt die betroffenen Atome und Moleküle wiederum in einen angeregten Zustand, wodurch unter anderem Bindungen leichter aufbrechen können. Ein Beispiel hierfür ist die Beschleunigung der Reaktionskinetik der Reduktion von ATP zu ADP nach der Bestrahlung mit sichtbarem Licht und NIR [259]. Durch die Anregung von ATP kommt es zu einer Destabilisierung der Bindung zwischen dem zweiten und dritten Phosphat der Phosphatkette, wodurch die Hydrolyse von ATP erleichtert wird. Auch kommt es durch das Anlegen eines elektrischen Feldes zu einer Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials, die zusammen mit der erhöhten ADP-Konzentration eine gesteigerte ATP-Syntheserate zur Folge hat. Neben der Aktivierung der COX durch die Wellenlängen kann so ein elektrisches Feld zu der Erhöhung des intrazellulären ROS-Levels führen [36]. Denkbar wäre folglich, dass die hier, unabhängig von der Bestrahlungszeit, beobachtete Entstehung von ROS



---

nach Applikation einer gleichen Energiedosis von  $360 \text{ kJ/m}^2$  durch ebendiese Mechanismen verursacht wird. Da *Reaktive Sauerstoffspezies* in physiologischen Konzentrationen als sekundäre Botenstoffe wirken, können sie so die Genexpression von Zellen beeinflussen [193, 252]. *Davis et al.* wiesen nach, dass in Abhängigkeit zur ROS-Konzentration Änderungen im Proliferationsverhalten von Zellen auftreten [194]. Möglicherweise verändert die hier durch  $360 \text{ kJ/m}^2$  entstandene ROS-Konzentration in den Zellen die Genexpression proliferationsassoziiierter Gene dementsprechend so, dass es sowohl durch NIR als auch durch wIRA zur Hemmung der Proliferation kommt.

Bemerkenswerterweise scheinen die durch die Dosis hervorgerufenen und somit vergleichbaren Effekte von wIRA und NIR eher kurzfristiger Natur zu sein. So zeigt sich in den kombiniert bestrahlten Zellen zwar sowohl bei der Untersuchung der BrdU-Aufnahmerate als auch bei der ROS-Levelbestimmung ein ähnliches Bild in den mit  $360 \text{ kJ/m}^2$  wIRA- im Vergleich zu den mit NIR-vorbestrahlten Zellen, jedoch fällt der Effekt in beiden Fällen, bezogen auf die jeweils ausschließlich mit nahem Infrarot A bestrahlten Zellen, deutlich geringer aus [11]. Ebenso, wie nach der Bestrahlung mit NIR, ist 48 h nach der Bestrahlung mit wIRA das Level an *Reaktiven Sauerstoffspezies* noch deutlich erhöht. In den kombiniert bestrahlten Zellen war der ROS-Anstieg nach NIR und 10 Gy mehr als additiv, in den mit wIRA und 10 Gy bestrahlten Zellen hingegen entspricht der Anstieg einer genauen Addition des Infrarot- und des Röntgeneffekts. Ebenso zeigt sich bei der Untersuchung der Proliferationsrate ein deutlicher Unterschied zwischen wIRA und NIR. NIR hatte auch zu diesem späten Zeitpunkt nach der Bestrahlung einen signifikant hemmenden Einfluss auf die BrdU-Aufnahmerate, wohingegen es durch die Bestrahlung mit wIRA zu einem hoch signifikanten Anstieg der Proliferationsrate kommt. Der Effekt der Kombination aus wIRA und 4 Gy führte zu einer deutlich stärkeren Reduktion des röntgeninduzierten Proliferationsstopps im Vergleich zu den mit NIR und Röntgen bestrahlten Zellen. Da jedoch schon wIRA alleine die Proliferation zu diesem Zeitpunkt steigert, scheint vor allem dieser Effekt für den erhöhten BrdU-Einbau verantwortlich zu sein.

Diese Unterschiede in der Wirkung von wIRA und NIR auf die durch Röntgenstrahlung verursachten Effekte zeigt deutlich, dass nicht nur die Dosis alleine ausschlaggebend für die langfristige Wirkung der nahen Infrarotwellenlängen ist. Durch die längere Einwirkzeit der nahen Infrarot-Wellenlängen bei der Bestrahlung mit NIR scheinen andere proliferationsassoziierte Signalwege zu wirken, als dies nach der relativ kurzen Bestrahlungszeit von 3 min bei wIRA der Fall ist. Diese unterschiedlichen Signalwege scheinen jedoch nicht allein mit der Wirkung der in beiden Fällen hochregulierten ROS zusammen zu hängen.

*Karu et al.* und andere postulieren, dass durch die Bestrahlung mit Wellenlängen des nahen Infrarotspektrums der sogenannte retrograd-mitochondriale Signalweg aktiviert wird [11, 38, 252]. Ziel dieser retrograden Kommunikation zwischen Mitochondrien und Zellkern ist die Anpassung der

---

Genexpression als Reaktion auf einen veränderten mitochondrialen Metabolismus [48, 49]. Im Zuge einer dieser Arbeit begleitenden Bachelorthesis konnte nachgewiesen werden, dass die hier gewählten NIR-Bestrahlungsparameter tatsächlich verschiedene Faktoren, wie die mitochondriale Masse und das mitochondriale Membranpotential, die mit der Aktivierung dieses Signalweges in Verbindung gebracht werden, über einen sehr langen Zeitraum beeinflussen [260]. Des Weiteren konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits ein Einfluss der NIR-Bestrahlung auf die Expression einer Reihe verschiedener Gene nachgewiesen werden [34, 199, 260]. Da bisher davon auszugehen ist, dass im Zellkern kein Chromophor für die Wellenlängen des NIR-Spektrums existiert, spricht dieser Nachweis der veränderten Genexpression für die Aktivierung der retrograden Kommunikation zwischen Mitochondrien und Kern nach  $360 \text{ kJ/m}^2$  NIR [38]. Eine mögliche Erklärung für die nachhaltig unterschiedliche Wirkung von wIRA und NIR trotz gleicher Dosis könnte demnach damit zusammenhängen, dass durch die unterschiedliche Zeit, in der die Wellenlängen auf die Mitochondrien wirken, unterschiedliche Parameter dieses Signalweges aktiviert werden, wodurch es zu einer stark abweichenden Genexpression käme.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die hier durchgeführte Bestrahlung mit wIRA und NIR in den ersten 24 h einheitliche Effekte hervorgerufen werden. Kurzfristig scheint für die Wirkung der Bestrahlung in Folge dessen die Dosis ausschlaggebend zu sein. Langfristig unterscheiden sich die Auswirkungen der Bestrahlungen jedoch deutlich, was zu dem Schluss führt, dass für diese Effekte wiederum die Bestrahlungszeit entscheidend ist. Im Zuge einer Therapie sollte deshalb immer das genaue Ziel der Bestrahlung definiert werden und an diese Fragestellung sollten die oben zusammengefassten Bestrahlungsparameter explizit angepasst werden.

#### 7.4. Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Bestrahlung mit  $360 \text{ kJ/m}^2$  NIR ( $18 \text{ mW/cm}^2$ , 35 min) 24 h vor einer Bestrahlung mit therapierelevanten Röntgendosen Einfluss auf die DNA-Reparatur, das Proliferationsverhalten sowie die Apoptoserate von Zellen im Gewebeverbund hat. Durch diese Beobachtungen ließ sich eindeutig zeigen, dass die von *Heslich et al.* gefundenen Effekte der NIR-Vorbestrahlung auf die röntgeninduzierte Stressantwort im Monolayer von großer medizinischer Relevanz sind. Die hier erbrachten Ergebnisse verdeutlichen zudem, dass die Kombination aus NIR und Röntgenstrahlung in der Zukunft noch detaillierter untersucht werden muss und der Einsatz einer Bestrahlung mit NIR im Rahmen einer strahlenbasierten Tumorthherapie genau bedacht werden sollte.

---

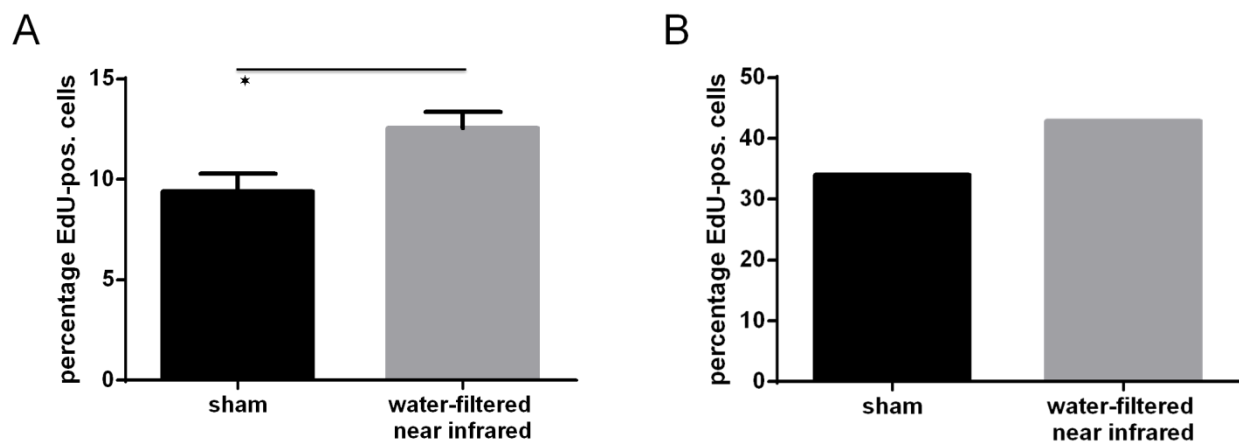
Bei der näheren Charakterisierung der molekularen Veränderungen, die zu dieser durch NIR veränderten Strahlenantwort führen, zeigte sich, dass eine Reihe von Faktoren, die an der Reparatur von DSBs beteiligt sind, negativ beeinflusst werden. Des Weiteren konnte der onkogene Transkriptionsfaktor FOXM1 als möglicher Kandidat für den Einfluss der NIR-Vorbestrahlung auf molekularer Ebene bestimmt werden. Diese Erkenntnisse zusammengefasst, lässt sich schlussfolgern, dass durch die Vorbestrahlung mit NIR essenzielle Signalwege der Schadensantwort von Zellen gestört werden. Dieser Einfluss wäre zwar für das umliegende Gewebe im Zuge einer Tumorthherapie gravierend, könnte sich aber als durchaus förderlich für eine schnellere Reduktion bestimmter Tumore herausstellen. Mit Hilfe von weiterführenden Untersuchungen an Tumorzellen könnte somit eine vielversprechende Alternativtherapie mit geringerer Strahlenbelastung gefunden werden. Möglicherweise ist der Einsatz einer NIR-Vorbestrahlung auch ein Lösungsansatz für besonders strahlenresistente Tumore, deren Schadensantwort so vorab geschwächt werden könnte. Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit ist, dass das Einbeziehen der Dosis und der Bestrahlungszeit bei der Erforschung solcher Therapieansätze mit NIR elementar ist. So können durch die Variation der Applikationszeit bei analoger Dosis völlig unterschiedliche zelluläre Antworten hervorgerufen und möglicherweise positive Effekte einer langsamen Applikation zunichte gemacht werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass die hier durchgeführten Untersuchungen ein weiteres Mal belegen, dass die Kombination aus wassergefiltertem Infrarot A und Röntgenstrahlung durchaus Potential für die Verbesserung strahlenbasierter Krebstherapie hat, die Gefahr einer unbedachten Exposition jedoch nicht unterschätzt werden darf.

## 8. Anhang

### 8.1. Einfluss naher Infrarotstrahlung auf basale Keratinozyten in der Maushaut und im Epidermismodell

Zusätzlich zum FTSM (4.2.3) wurde die Wirkung von NIR auf die Proliferation in zwei weiteren Kultursystemen untersucht. Nachfolgend sind die Ergebnisse dieser Studien mit murinen Vollhautpräparaten und humanen Epidermismodellen dargestellt.



**Abbildung 51: NIR wirkt sowohl in den basalen Keratinozyten der Maushaut als auch im humanen Epidermismodell proliferationsfördernd.**

(A) p4-Mäuse wurden dekaptiert und Haut vom Rücken der Tiere präparativ entfernt. Die Haut wurde für 1 h in Kultur genommen (Flüssigkeitsphasengrenze, DMEM supplementiert mit 10% FCS, 2mM L-glutamine, 1% Penicillin/Streptomycin), um den akuten Stress der Präparation abklingen zu lassen. Die Bestrahlung mit 360 kJ/m<sup>2</sup> NIR wurde in Bestrahlungsmedium durchgeführt. Nach der Bestrahlung wurde ein Medienwechsel durchgeführt und dem Medium 100 µM EdU zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde die Haut mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und 12 µm Kryoschnitte des Präparates angefertigt. Mit Hilfe des EdU-Click Assay (PANATecs, Germany) wurde der EdU-Einbau in den Zellkernen nachgewiesen. Die Detektion EdU-positiver Zellkerne wurde mit Hilfe eines Axio Observer D1 Mikroskops durchgeführt. Quantifiziert wurden 500 Zellen. Hierbei zeigte sich, dass die Bestrahlung mit NIR in murinen Vollhautpräparaten zu einer erhöhten Proliferationsrate führt.

(B) Primäre humane Keratinozyten wurden in Zellkulturinserts (Merck Millipore, Germany) gesät und submers für 6 Tage in DermaLife K Complete Medium kultiviert. Anschließend wurde der so entstandene konfluente Zellrasen an die Flüssigkeitsphasengrenze gehoben und bis zur vollständigen Differenzierung weiterkultiviert. Für die NIR-Bestrahlung mit 360 kJ/m<sup>2</sup> wurde das Kulturmedium gegen Bestrahlungsmedium ausgetauscht. Nach der Bestrahlung wurden die Modelle für 24 h in DermaLife K Complete Medium mit 10 µM EdU weiterkultiviert. Für die Fixierung wurden die zellbewachsenen Membranen mit Hilfe eines Skalpells aus dem Zellkulturinsert herausgeschnitten und für 1 h in 4% PFA fixiert. Von den Epidermismodellen wurden ebenfalls 12 µm Kryoschnitte angefertigt und der Einbau von EdU in den basalen Keratinozyten mit Hilfe des EdU-Click Assay (PANATecs, Germany) nachgewiesen. Quantifiziert wurde die EdU-Einbaurrate in 100 Zellen. NIR hat auch in diesem Zellkultursystem eine proliferationsfördernde Wirkung. Die Werte repräsentieren den Mittelwert aus mehreren unabhängigen Versuchen (Maushaut n=3, Epidermismodell n=1, +/- Standardfehler, unpaired two-tailed students t-test CI=95%, \* P<0,05).

---

## Literaturverzeichnis

---

1. Abraham, E.H., et al. *Application and Possible Mechanisms of Combining LLLT (Low Level Laser Therapy), Infrared Hyperthermia and Ionizing Radiation in the Treatment of Cancer*. . in *SPIE Bios, Mechanisms for Low-Light Therapy IX*. 2014. San Francisco, USA.
2. Oncology, B.o.F.o.C., *Radiotherapy Dose-Fractionation*. London: Royal College of Radiologists., 2006.
3. Whelan, H.T., et al., *Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing*. *J Clin Laser Med Surg*, 2001. 19(6): p. 305-314.
4. Hoffmann, G., *Water-filtered infrared-A (wIRA) in acute and chronic wounds*. *GMS Krankenhhyg Interdiszip*, 2009. 4(2): p. Doc12.
5. Hoffmann, G., *Principles and working mechanisms of water-filtered infrared-A (wIRA) in relation to wound healing*. *GMS Krankenhhyg Interdiszip*, 2007. 2(2): p. Doc54.
6. Swanson, C.P. and H.T. Yost, *The Induction of Activated, Stable States in the Chromosomes of Tradescantia by Infra-red and X-Rays*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1951. 37(12): p. 796-802.
7. Yost, H.T., Jr., *The frequency of x-ray induced chromosome aberrations in Tradescantia as modified by near infrared radiation*. *Genetics*, 1951. 36(2): p. 176-84.
8. Yost, H.T., *The Effect of Intensity of Infrared on X-Ray Induced Chromosome Aberrations in Tradescantia*. *Genetics*, 1952. 37(5): p. 457-68.
9. Ives, P.T., et al., *The Effects of Infra-Red Radiation and Desiccation on Crossingover in Drosophila Melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1953. 39(11): p. 1134-41.
10. Young, W.J., et al., *The Effect of Pretreatment with Infra-Red Radiation on the X-ray Induced Sex-Linked Recessive Lethal and Visible Mutation Rate in Drosophila Melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1953. 39(6): p. 488-95.
11. Heselich, A., et al., *Near-infrared exposure changes cellular responses to ionizing radiation*. *Photochem Photobiol*, 2012. 88(1): p. 135-46.
12. Ziv, Y., et al., *Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway*. *Nat Cell Biol*, 2006. 8(8): p. 870-6.
13. Goodarzi, A.A., A.T. Noon, and P.A. Jeggo, *The impact of heterochromatin on DSB repair*. *Biochem Soc Trans*, 2009. 37(Pt 3): p. 569-76.
14. Cann, K.L. and G. Dellaire, *Heterochromatin and the DNA damage response: the need to relax*. *Biochem Cell Biol*, 2011. 89(1): p. 45-60.
15. Roff, M., et al., *Role of IkappaBalpha ubiquitination in signal-induced activation of NFkappaB in vivo*. *J Biol Chem*, 1996. 271(13): p. 7844-50.
16. Oeckinghaus, A., M.S. Hayden, and S. Ghosh, *Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways*. *Nat Immunol*, 2011. 12(8): p. 695-708.
17. Proksch, E., J.M. Brandner, and J.M. Jensen, *The skin: an indispensable barrier*. *Exp Dermatol*, 2008. 17(12): p. 1063-72.
18. Brohem, C.A., et al., *Artificial skin in perspective: concepts and applications*. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2011. 24(1): p. 35-50.

19. Ajani, G., et al., *Cellular responses to disruption of the permeability barrier in a three-dimensional organotypic epidermal model*. Exp Cell Res, 2007. 313(14): p. 3005-15.
20. Kanitakis, J., *Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin*. Eur J Dermatol, 2002. 12(4): p. 390-9; quiz 400-1.
21. Boyce, S.T. and G.D. Warden, *Principles and practices for treatment of cutaneous wounds with cultured skin substitutes*. Am J Surg, 2002. 183(4): p. 445-56.
22. Muffler, S., et al., *A stable niche supports long-term maintenance of human epidermal stem cells in organotypic cultures*. Stem Cells, 2008. 26(10): p. 2506-15.
23. Blanpain, C. and E. Fuchs, *Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. 10(3): p. 207-17.
24. Hoath, S.B. and D.G. Leahy, *The organization of human epidermis: functional epidermal units and phi proportionality*. J Invest Dermatol, 2003. 121(6): p. 1440-6.
25. Gibbs, S., et al., *Melanosome capping of keratinocytes in pigmented reconstructed epidermis--effect of ultraviolet radiation and 3-isobutyl-1-methyl-xanthine on melanogenesis*. Pigment Cell Res, 2000. 13(6): p. 458-66.
26. Laubach, V., et al., *Integration of Langerhans-like cells into a human skin equivalent*. Arch Dermatol Res, 2011. 303(2): p. 135-9.
27. Smalley, K.S., M. Lioni, and M. Herlyn, *Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2006. 42(8-9): p. 242-7.
28. Cukierman, E., et al., *Taking cell-matrix adhesions to the third dimension*. Science, 2001. 294(5547): p. 1708-12.
29. Maas-Szabowski, N., H.J. Stark, and N.E. Fusenig, *Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1-induced keratinocyte growth factor expression in resting fibroblasts*. J Invest Dermatol, 2000. 114(6): p. 1075-84.
30. Warters, R.L., et al., *Differential gene expression in primary human skin keratinocytes and fibroblasts in response to ionizing radiation*. Radiat Res, 2009. 172(1): p. 82-95.
31. Howling, G.I., et al., *The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro*. Biomaterials, 2001. 22(22): p. 2959-66.
32. Golinski, P.A., et al., *[Development of an engraftable skin equivalent based on matriderm with human keratinocytes and fibroblasts]*. Handchir Mikrochir Plast Chir, 2009. 41(6): p. 327-32.
33. Hahn, W.C., et al., *Creation of human tumour cells with defined genetic elements*. Nature, 1999. 400(6743): p. 464-8.
34. König, A., *Untersuchungen zum Einfluss naher Infrarotstrahlung und deren Kombination mit ionisierender Strahlung auf retinale 3D-Zellkulturen und Gewebe*, 2011.
35. Halasz, C.L., *Treatment of common warts using the infrared coagulator*. J Dermatol Surg Oncol, 1994. 20(4): p. 252-6.
36. Amat, A., et al., *The electric field induced by light can explain cellular responses to electromagnetic energy: a hypothesis of mechanism*. J Photochem Photobiol B, 2006. 82(2): p. 152-60.
37. Pastore, D., M. Greco, and S. Passarella, *Specific helium-neon laser sensitivity of the purified cytochrome c oxidase*. Int J Radiat Biol, 2000. 76(6): p. 863-70.



- 
38. Karu, T.I., *Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation*. Photochem Photobiol, 2008. 84(5): p. 1091-9.
  39. Amat, A., et al., *Effect of red and near-infrared laser light on adenosine triphosphate (ATP) in the luciferine-luciferase reaction*. Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry, 2004. 168(1-2): p. 59-65.
  40. Zastrow, L., et al., *The missing link--light-induced (280-1,600 nm) free radical formation in human skin*. Skin Pharmacol Physiol, 2009. 22(1): p. 31-44.
  41. Karu, T.I., *Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation*. IUBMB Life, 2010. 62(8): p. 607-10.
  42. Schroeder, P., et al., *Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling*. Free Radic Biol Med, 2007. 43(1): p. 128-35.
  43. Karu, T.I., et al., *[Effect of irradiation with monochromatic visible light on the cAMP content in mammalian cells]*. Dokl Akad Nauk SSSR, 1985. 281(5): p. 1242-4.
  44. Hu, W.P., et al., *Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria*. J Invest Dermatol, 2007. 127(8): p. 2048-57.
  45. Vacca, R.A., et al., *The irradiation of hepatocytes with He-Ne laser causes an increase of cytosolic free calcium concentration and an increase of cell membrane potential, correlated with it, both increases taking place in an oscillatory manner*. Biochem Mol Biol Int, 1997. 43(5): p. 1005-14.
  46. Alexandratou, E., et al., *Human fibroblast alterations induced by low power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy*. Photochem Photobiol Sci, 2002. 1(8): p. 547-52.
  47. Zhang, Y., et al., *cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light*. J Invest Dermatol, 2003. 120(5): p. 849-57.
  48. Kotiadis, V.N., M.R. Duchon, and L.D. Osellame, *Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health*. Biochim Biophys Acta, 2014. 1840(4): p. 1254-65.
  49. Liu, Z. and R.A. Butow, *Mitochondrial retrograde signaling*. Annu Rev Genet, 2006. 40: p. 159-85.
  50. Frank, S., et al., *Infrared radiation affects the mitochondrial pathway of apoptosis in human fibroblasts*. J Invest Dermatol, 2004. 123(5): p. 823-31.
  51. Frank, S., et al., *Infrared radiation induces the p53 signaling pathway: role in infrared prevention of ultraviolet B toxicity*. Exp Dermatol, 2006. 15(2): p. 130-7.
  52. Schieke, S., et al., *Infrared-A radiation-induced matrix metalloproteinase 1 expression is mediated through extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in human dermal fibroblasts*. J Invest Dermatol, 2002. 119(6): p. 1323-9.
  53. Kim, H.H., et al., *Augmentation of UV-induced skin wrinkling by infrared irradiation in hairless mice*. Mech Ageing Dev, 2005. 126(11): p. 1170-7.
  54. Piazena, H. and D.K. Kelleher, *Effects of infrared-A irradiation on skin: discrepancies in published data highlight the need for an exact consideration of physical and photobiological laws and appropriate experimental settings*. Photochem Photobiol, 2010. 86(3): p. 687-705.
  55. Barker, S., et al., *Identification of mammalian proteins cross-linked to DNA by ionizing radiation*. J Biol Chem, 2005. 280(40): p. 33826-38.
-

- 
56. Breen, A.P. and J.A. Murphy, *Reactions of oxyl radicals with DNA*. Free Radic Biol Med, 1995. 18(6): p. 1033-77.
  57. Christmann, M., et al., *Mechanisms of human DNA repair: an update*. Toxicology, 2003. 193(1-2): p. 3-34.
  58. Iliakis, G., et al., *DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation*. Oncogene, 2003. 22(37): p. 5834-47.
  59. Dodson, H., S.P. Wheatley, and C.G. Morrison, *Involvement of centrosome amplification in radiation-induced mitotic catastrophe*. Cell Cycle, 2007. 6(3): p. 364-70.
  60. Suzuki, K., et al., *Delayed activation of DNA damage checkpoint and radiation-induced genomic instability*. Mutat Res, 2006. 597(1-2): p. 73-7.
  61. Blokhina, O. and K.V. Fagerstedt, *Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation*. Plant Physiol Biochem, 2010. 48(5): p. 359-73.
  62. Kaufmann, B.P., A. Hollaender, and H. Gay, *Modification of the frequency of chromosomal rearrangements induced by x-rays in Drosophila; use of near infrared radiation*. Genetics, 1946. 31: p. 349-67.
  63. Kaufmann, B.P. and K. Wilson, *Modification of the Frequency of Chromosomal Rearrangements Induced by X-Rays in Drosophila. IV. Posttreatment with near Infrared Radiation*. Genetics, 1949. 34(4): p. 425-36.
  64. Glass, B., *A Comparative Study of Induced Mutation in the Oocytes and Spermatozoa of Drosophila Melanogaster II. Deficiencies and Minutes*. Genetics, 1955. 40(2): p. 252-67.
  65. Karu, T., L. Pyatibrat, and G. Kalendo, *Irradiation with He-Ne laser can influence the cytotoxic response of HeLa cells to ionizing radiation*. Int J Radiat Biol, 1994. 65(6): p. 691-7.
  66. Jeggo, P.A. and M. Lobrich, *DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact?* Oncogene, 2007. 26(56): p. 7717-9.
  67. Khanna, K.K. and S.P. Jackson, *DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection*. Nat Genet, 2001. 27(3): p. 247-54.
  68. Nakano, H. and K. Shinohara, *X-ray-induced cell death: apoptosis and necrosis*. Radiat Res, 1994. 140(1): p. 1-9.
  69. Uziel, T., et al., *Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage*. EMBO J, 2003. 22(20): p. 5612-21.
  70. Savitsky, K., et al., *A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase*. Science, 1995. 268(5218): p. 1749-53.
  71. Bakkenist, C.J. and M.B. Kastan, *DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation*. Nature, 2003. 421(6922): p. 499-506.
  72. So, S., A.J. Davis, and D.J. Chen, *Autophosphorylation at serine 1981 stabilizes ATM at DNA damage sites*. J Cell Biol, 2009. 187(7): p. 977-90.
  73. Yuan, J., R. Adamski, and J. Chen, *Focus on histone variant H2AX: to be or not to be*. FEBS Lett, 2010. 584(17): p. 3717-24.
  74. Rogakou, E.P., et al., *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. J Biol Chem, 1998. 273(10): p. 5858-68.
-



- 
75. Bhatti, S., et al., *ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress*. Cell Mol Life Sci, 2011. 68(18): p. 2977-3006.
  76. Celeste, A., et al., *Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks*. Nat Cell Biol, 2003. 5(7): p. 675-9.
  77. Mallette, F.A., et al., *RNF8- and RNF168-dependent degradation of KDM4A/JMJD2A triggers 53BP1 recruitment to DNA damage sites*. EMBO J, 2012. 31(8): p. 1865-78.
  78. Huen, M.S., et al., *RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly*. Cell, 2007. 131(5): p. 901-14.
  79. Panier, S. and D. Durocher, *Regulatory ubiquitylation in response to DNA double-strand breaks*. DNA Repair (Amst), 2009. 8(4): p. 436-43.
  80. Doil, C., et al., *RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins*. Cell, 2009. 136(3): p. 435-46.
  81. Auerbeck, N.B., et al., *DNA end resection is needed for the repair of complex lesions in G1-phase human cells*. Cell Cycle, 2014. 13(16): p. 2509-16.
  82. Rothkamm, K., et al., *Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle*. Mol Cell Biol, 2003. 23(16): p. 5706-15.
  83. van Gent, D.C. and M. van der Burg, *Non-homologous end-joining, a sticky affair*. Oncogene, 2007. 26(56): p. 7731-40.
  84. Weterings, E. and D.C. van Gent, *The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synopsis*. DNA Repair (Amst), 2004. 3(11): p. 1425-35.
  85. Walker, J.R., R.A. Corpina, and J. Goldberg, *Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair*. Nature, 2001. 412(6847): p. 607-14.
  86. Mahaney, B.L., K. Meek, and S.P. Lees-Miller, *Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining*. Biochem J, 2009. 417(3): p. 639-50.
  87. Nick McElhinny, S.A., et al., *Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends*. Mol Cell Biol, 2000. 20(9): p. 2996-3003.
  88. Chen, L., et al., *Interactions of the DNA ligase IV-XRCC4 complex with DNA ends and the DNA-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 2000. 275(34): p. 26196-205.
  89. D'Amours, D. and S.P. Jackson, *The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. 3(5): p. 317-27.
  90. Mimitou, E.P. and L.S. Symington, *DNA end resection: many nucleases make light work*. DNA Repair (Amst), 2009. 8(9): p. 983-95.
  91. Sartori, A.A., et al., *Human CtIP promotes DNA end resection*. Nature, 2007. 450(7169): p. 509-14.
  92. Gravel, S., et al., *DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection*. Genes Dev, 2008. 22(20): p. 2767-72.
  93. Wang, X. and J.E. Haber, *Role of Saccharomyces single-stranded DNA-binding protein RPA in the strand invasion step of double-strand break repair*. PLoS Biol, 2004. 2(1): p. E21.
  94. Yang, H., et al., *BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure*. Science, 2002. 297(5588): p. 1837-48.
-

95. Stauffer, M.E. and W.J. Chazin, *Physical interaction between replication protein A and Rad51 promotes exchange on single-stranded DNA*. J Biol Chem, 2004. 279(24): p. 25638-45.
96. Jackson, S.P. and J. Bartek, *The DNA-damage response in human biology and disease*. Nature, 2009. 461(7267): p. 1071-8.
97. Heyer, W.D., *Recombination: Holliday junction resolution and crossover formation*. Curr Biol, 2004. 14(2): p. R56-8.
98. Plank, J.L., J. Wu, and T.S. Hsieh, *Topoisomerase IIIalpha and Bloom's helicase can resolve a mobile double Holliday junction substrate through convergent branch migration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(30): p. 11118-23.
99. Goodarzi, A.A., P. Jeggo, and M. Lobrich, *The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax*. DNA Repair (Amst), 2010. 9(12): p. 1273-82.
100. Bartova, E., et al., *Histone modifications and nuclear architecture: a review*. J Histochem Cytochem, 2008. 56(8): p. 711-21.
101. Goodarzi, A.A., et al., *ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin*. Mol Cell, 2008. 31(2): p. 167-77.
102. Slijepcevic, P. and A.T. Natarajan, *Distribution of radiation-induced G1 exchange and terminal deletion breakpoints in Chinese hamster chromosomes as detected by G banding*. Int J Radiat Biol, 1994. 66(6): p. 747-55.
103. Riballo, E., et al., *A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci*. Mol Cell, 2004. 16(5): p. 715-24.
104. D'Amours, D., et al., *Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions*. Biochem J, 1999. 342 ( Pt 2): p. 249-68.
105. Luo, X. and W.L. Kraus, *On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1*. Genes Dev, 2012. 26(5): p. 417-32.
106. Kim, M.Y., T. Zhang, and W.L. Kraus, *Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD+ into a nuclear signal*. Genes Dev, 2005. 19(17): p. 1951-67.
107. Swindall, A.F., J.A. Stanley, and E.S. Yang, *PARP-1: Friend or Foe of DNA Damage and Repair in Tumorigenesis?* Cancers (Basel), 2013. 5(3): p. 943-58.
108. Ji, Y. and A.V. Tulin, *The roles of PARP1 in gene control and cell differentiation*. Curr Opin Genet Dev, 2010. 20(5): p. 512-8.
109. Lukas, J., C. Lukas, and J. Bartek, *More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance*. Nat Cell Biol, 2011. 13(10): p. 1161-9.
110. Lindahl, T., et al., *Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks*. Trends Biochem Sci, 1995. 20(10): p. 405-11.
111. Menissier-de Murcia, J., et al., *Zinc-binding domain of poly(ADP-ribose)polymerase participates in the recognition of single strand breaks on DNA*. J Mol Biol, 1989. 210(1): p. 229-33.
112. Gradwohl, G., et al., *The second zinc-finger domain of poly(ADP-ribose) polymerase determines specificity for single-stranded breaks in DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(8): p. 2990-4.
113. Eustermann, S., et al., *The DNA-binding domain of human PARP-1 interacts with DNA single-strand breaks as a monomer through its second zinc finger*. J Mol Biol, 2011. 407(1): p. 149-70.

114. Strom, C.E., et al., *Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate*. Nucleic Acids Res, 2011. 39(8): p. 3166-75.
115. Horton, J.K., et al., *XRCC1 and DNA polymerase beta in cellular protection against cytotoxic DNA single-strand breaks*. Cell Res, 2008. 18(1): p. 48-63.
116. Aguilar-Quesada, R., et al., *Interaction between ATM and PARP-1 in response to DNA damage and sensitization of ATM deficient cells through PARP inhibition*. BMC Mol Biol, 2007. 8: p. 29.
117. Wang, M., et al., *PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways*. Nucleic Acids Res, 2006. 34(21): p. 6170-82.
118. Iliakis, G., *Backup pathways of NHEJ in cells of higher eukaryotes: cell cycle dependence*. Radiother Oncol, 2009. 92(3): p. 310-5.
119. Audebert, M., B. Salles, and P. Calsou, *Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining*. J Biol Chem, 2004. 279(53): p. 55117-26.
120. Hassa, P.O. and M.O. Hottiger, *A role of poly (ADP-ribose) polymerase in NF-kappaB transcriptional activation*. Biol Chem, 1999. 380(7-8): p. 953-9.
121. Soldani, C. and A.I. Scovassi, *Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update*. Apoptosis, 2002. 7(4): p. 321-8.
122. Ame, J.C., et al., *Radiation-induced mitotic catastrophe in PARG-deficient cells*. J Cell Sci, 2009. 122(Pt 12): p. 1990-2002.
123. Kaestner, K.H., W. Knochel, and D.E. Martinez, *Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors*. Genes Dev, 2000. 14(2): p. 142-6.
124. Helma D. C. Schwenen, L.J.M., Miranda S. C. Wilson & Eric W.-F. Lam *FOXM1 Homo sapiens forkhead box M1*. Transcription Factor Encyclopedia, 2010.
125. Wierstra, I. and J. Alves, *FOXM1, a typical proliferation-associated transcription factor*. Biol Chem, 2007. 388(12): p. 1257-74.
126. Le Lay, J. and K.H. Kaestner, *The Fox genes in the liver: from organogenesis to functional integration*. Physiol Rev, 2010. 90(1): p. 1-22.
127. Gemenetzidis, E., et al., *Induction of human epithelial stem/progenitor expansion by FOXM1*. Cancer Res, 2010. 70(22): p. 9515-26.
128. Teh, M.T., et al., *FOXM1 is a downstream target of Gli1 in basal cell carcinomas*. Cancer Res, 2002. 62(16): p. 4773-80.
129. Wonsey, D.R. and M.T. Follettie, *Loss of the forkhead transcription factor FoxM1 causes centrosome amplification and mitotic catastrophe*. Cancer Res, 2005. 65(12): p. 5181-9.
130. Teh, M.T., *FOXM1 coming of age: time for translation into clinical benefits?* Front Oncol, 2012. 2: p. 146.
131. Wang, I.C., et al., *Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase*. Mol Cell Biol, 2005. 25(24): p. 10875-94.
132. Costa, R.H., *FoxM1 dances with mitosis*. Nat Cell Biol, 2005. 7(2): p. 108-10.

133. Laoukili, J., et al., *FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability*. Nat Cell Biol, 2005. 7(2): p. 126-36.
134. Cooke, C.A., R.L. Bernat, and W.C. Earnshaw, *CENP-B: a major human centromere protein located beneath the kinetochore*. J Cell Biol, 1990. 110(5): p. 1475-88.
135. Sugimoto, K., R. Fukuda, and M. Himeno, *Centromere/kinetochore localization of human centromere protein A (CENP-A) exogenously expressed as a fusion to green fluorescent protein*. Cell Struct Funct, 2000. 25(4): p. 253-61.
136. Toralova, T., et al., *Silencing CENPF in bovine preimplantation embryo induces arrest at 8-cell stage*. Reproduction, 2009. 138(5): p. 783-91.
137. Du, J., et al., *The mitotic checkpoint kinase NEK2A regulates kinetochore microtubule attachment stability*. Oncogene, 2008. 27(29): p. 4107-14.
138. Faragher, A.J. and A.M. Fry, *Nek2A kinase stimulates centrosome disjunction and is required for formation of bipolar mitotic spindles*. Mol Biol Cell, 2003. 14(7): p. 2876-89.
139. Hochegger, H., N. Hegarat, and J.B. Pereira-Leal, *Aurora at the pole and equator: overlapping functions of Aurora kinases in the mitotic spindle*. Open Biol, 2013. 3(3): p. 120185.
140. Zona, S., et al., *FOXM1: an emerging master regulator of DNA damage response and genotoxic agent resistance*. Biochim Biophys Acta, 2014. 1839(11): p. 1316-22.
141. Khongkow, P., et al., *FOXM1 targets NBS1 to regulate DNA damage-induced senescence and epirubicin resistance*. Oncogene, 2014. 33(32): p. 4144-55.
142. Zhou, J., et al., *FOXM1 modulates cisplatin sensitivity by regulating EXO1 in ovarian cancer*. PLoS One, 2014. 9(5): p. e96989.
143. Tan, Y., P. Raychaudhuri, and R.H. Costa, *Chk2 mediates stabilization of the FoxM1 transcription factor to stimulate expression of DNA repair genes*. Mol Cell Biol, 2007. 27(3): p. 1007-16.
144. Teh, M.T., et al., *Upregulation of FOXM1 induces genomic instability in human epidermal keratinocytes*. Mol Cancer, 2010. 9: p. 45.
145. Yan, S., M. Sorrell, and Z. Berman, *Functional interplay between ATM/ATR-mediated DNA damage response and DNA repair pathways in oxidative stress*. Cell Mol Life Sci, 2014. 71(20): p. 3951-67.
146. Zhao, J.L., et al., *Conversion of danger signals into cytokine signals by hematopoietic stem and progenitor cells for regulation of stress-induced hematopoiesis*. Cell Stem Cell, 2014. 14(4): p. 445-59.
147. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature, 2001. 410(6824): p. 37-40.
148. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. 129(7): p. 1261-74.
149. Koromilas, A.E., *Roles of the translation initiation factor eIF2alpha serine 51 phosphorylation in cancer formation and treatment*. Biochim Biophys Acta, 2015. 1849(7): p. 871-80.
150. Loughery, J., et al., *Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters*. Nucleic Acids Res, 2014. 42(12): p. 7666-80.
151. Wei, C.L., et al., *A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome*. Cell, 2006. 124(1): p. 207-19.

152. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Signaling to NF-kappaB*. Genes Dev, 2004. 18(18): p. 2195-224.
153. Shi, Y. and J. Massague, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. Cell, 2003. 113(6): p. 685-700.
154. Sanchez-Capelo, A., *Dual role for TGF-beta1 in apoptosis*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. 16(1): p. 15-34.
155. Wu, J.W., et al., *Formation of a stable heterodimer between Smad2 and Smad4*. J Biol Chem, 2001. 276(23): p. 20688-94.
156. Cohen, G.M., *Caspases: the executioners of apoptosis*. Biochem J, 1997. 326 ( Pt 1): p. 1-16.
157. Lazebnik, Y.A., et al., *Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE*. Nature, 1994. 371(6495): p. 346-7.
158. Yang, E., et al., *Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death*. Cell, 1995. 80(2): p. 285-91.
159. Hayakawa, J., et al., *Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin*. Cancer Res, 2000. 60(21): p. 5988-94.
160. Ambrosini, G., C. Adida, and D.C. Altieri, *A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma*. Nat Med, 1997. 3(8): p. 917-21.
161. Sisson, T.H., et al., *Increased survivin expression contributes to apoptosis-resistance in IPF fibroblasts*. Adv Biosci Biotechnol, 2012. 3(6A): p. 657-664.
162. Johnson, M.E. and E.W. Howerth, *Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein*. Vet Pathol, 2004. 41(6): p. 599-607.
163. Arrigo, A.P., *The cellular "networking" of mammalian Hsp27 and its functions in the control of protein folding, redox state and apoptosis*. Adv Exp Med Biol, 2007. 594: p. 14-26.
164. Zhang, C.L., et al., *Action potentials induce uniform calcium influx in mammalian myelinated optic nerves*. J Neurophysiol, 2006. 96(2): p. 695-709.
165. Mackenzie, L., et al., *Predetermined recruitment of calcium release sites underlies excitation-contraction coupling in rat atrial myocytes*. J Physiol, 2001. 530(Pt 3): p. 417-29.
166. Berridge, M.J., P. Lipp, and M.D. Bootman, *The versatility and universality of calcium signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. 1(1): p. 11-21.
167. Bronner, F., *Extracellular and intracellular regulation of calcium homeostasis*. ScientificWorldJournal, 2001. 1: p. 919-25.
168. Berridge, M.J., *Calcium signalling remodelling and disease*. Biochem Soc Trans, 2012. 40(2): p. 297-309.
169. Hamilton, S.L., *Ryanodine receptors*. Cell Calcium, 2005. 38(3-4): p. 253-60.
170. Foskett, J.K., et al., *Inositol trisphosphate receptor Ca<sup>2+</sup> release channels*. Physiol Rev, 2007. 87(2): p. 593-658.
171. van Haasteren, G., et al., *Calcium signalling and gene expression*. J Recept Signal Transduct Res, 1999. 19(1-4): p. 481-92.
172. Buck, J., et al., *Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(1): p. 79-84.



- 
173. Sunahara, R.K., C.W. Dessauer, and A.G. Gilman, *Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1996. 36: p. 461-80.
  174. Mons, N., et al., *Ca<sup>2+</sup>-sensitive adenylyl cyclases, key integrators of cellular signalling*. Life Sci, 1998. 62(17-18): p. 1647-52.
  175. Zaccolo, M., et al., *Restricted diffusion of a freely diffusible second messenger: mechanisms underlying compartmentalized cAMP signalling*. Biochem Soc Trans, 2006. 34(Pt 4): p. 495-7.
  176. Schmidt, M., F.J. Dekker, and H. Maarsingh, *Exchange protein directly activated by cAMP (epac): a multidomain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions*. Pharmacol Rev, 2013. 65(2): p. 670-709.
  177. Houslay, M.D. and W. Kolch, *Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling*. Mol Pharmacol, 2000. 58(4): p. 659-68.
  178. Boneh, A., *Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation by second messenger-mediated signal transduction mechanisms*. Cell Mol Life Sci, 2006. 63(11): p. 1236-48.
  179. Sands, W.A. and T.M. Palmer, *Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation*. Cell Signal, 2008. 20(3): p. 460-6.
  180. Baillie, G.S., J.D. Scott, and M.D. Houslay, *Compartmentalisation of phosphodiesterases and protein kinase A: opposites attract*. FEBS Lett, 2005. 579(15): p. 3264-70.
  181. Gold, M.G., T. Gonen, and J.D. Scott, *Local cAMP signaling in disease at a glance*. J Cell Sci, 2013. 126(Pt 20): p. 4537-43.
  182. Gold, M.G., et al., *AKAP2 anchors PKA with aquaporin-0 to support ocular lens transparency*. EMBO Mol Med, 2012. 4(1): p. 15-26.
  183. Marquette, A., et al., *ERK and PDE4 cooperate to induce RAF isoform switching in melanoma*. Nat Struct Mol Biol, 2011. 18(5): p. 584-91.
  184. Thannickal, V.J. and B.L. Fanburg, *Reactive oxygen species in cell signaling*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. 279(6): p. L1005-28.
  185. Bae, Y.S., et al., *Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling*. Mol Cells, 2011. 32(6): p. 491-509.
  186. Murley, J.S., et al., *SOD2-mediated effects induced by WR1065 and low-dose ionizing radiation on micronucleus formation in RKO human colon carcinoma cells*. Radiat Res, 2011. 175(1): p. 57-65.
  187. Switala, J. and P.C. Loewen, *Diversity of properties among catalases*. Arch Biochem Biophys, 2002. 401(2): p. 145-54.
  188. Diaz Vivancos, P., et al., *A nuclear glutathione cycle within the cell cycle*. Biochem J, 2010. 431(2): p. 169-78.
  189. Brieger, K., et al., *Reactive oxygen species: from health to disease*. Swiss Med Wkly, 2012. 142: p. w13659.
  190. Simon, H.U., A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer, *Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction*. Apoptosis, 2000. 5(5): p. 415-8.
  191. Krause, K.H. and K. Bedard, *NOX enzymes in immuno-inflammatory pathologies*. Semin Immunopathol, 2008. 30(3): p. 193-4.
-

192. Barrett, W.C., et al., *Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B*. J Biol Chem, 1999. 274(49): p. 34543-6.
193. Abate, C., et al., *Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro*. Science, 1990. 249(4973): p. 1157-61.
194. Davies, K.J., *The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress*. IUBMB Life, 1999. 48(1): p. 41-7.
195. Kegel, P., et al., *X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact*. DNA Repair (Amst), 2007. 6(11): p. 1692-7.
196. Belli, M., O. Sapora, and M.A. Tabocchini, *Molecular targets in cellular response to ionizing radiation and implications in space radiation protection*. J Radiat Res, 2002. 43 Suppl: p. S13-9.
197. Giglia-Mari, G., A. Zotter, and W. Vermeulen, *DNA damage response*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. 3(1): p. a000745.
198. Gupta, A., et al., *Role of 53BP1 in the regulation of DNA double-strand break repair pathway choice*. Radiat Res, 2014. 181(1): p. 1-8.
199. Heselich, A., *Einfluss naher Infrarotstrahlung auf die durch ionisierende Strahlung induzierten zellulären Veränderungen*, 2011.
200. Korver, W., et al., *Uncoupling of S phase and mitosis in cardiomyocytes and hepatocytes lacking the winged-helix transcription factor Trident*. Curr Biol, 1998. 8(24): p. 1327-30.
201. Castedo, M., et al., *Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition*. Oncogene, 2004. 23(16): p. 2825-37.
202. Du, Y.C., et al., *The dynamic alterations of H2AX complex during DNA repair detected by a proteomic approach reveal the critical roles of Ca(2+)/calmodulin in the ionizing radiation-induced cell cycle arrest*. Mol Cell Proteomics, 2006. 5(6): p. 1033-44.
203. Bentle, M.S., et al., *Calcium-dependent modulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 alters cellular metabolism and DNA repair*. J Biol Chem, 2006. 281(44): p. 33684-96.
204. Zhao, Q.L., et al., *Mitochondrial and intracellular free-calcium regulation of radiation-induced apoptosis in human leukemic cells*. Int J Radiat Biol, 1999. 75(4): p. 493-504.
205. Rugo, R.E. and R.H. Schiestl, *Increases in oxidative stress in the progeny of X-irradiated cells*. Radiat Res, 2004. 162(4): p. 416-25.
206. Erenpreisa, J., et al., *Segregation of genomes in polyploid tumour cells following mitotic catastrophe*. Cell Biol Int, 2005. 29(12): p. 1005-11.
207. Frohns, A., et al., *Inefficient double-strand break repair in murine rod photoreceptors with inverted heterochromatin organization*. Curr Biol, 2014. 24(10): p. 1080-90.
208. Schuler, N. and C.E. Rube, *Accumulation of DNA damage-induced chromatin alterations in tissue-specific stem cells: the driving force of aging?* PLoS One, 2013. 8(5): p. e63932.
209. Suzuki, K., M. Nakashima, and S. Yamashita, *Dynamics of ionizing radiation-induced DNA damage response in reconstituted three-dimensional human skin tissue*. Radiat Res, 2010. 174(4): p. 415-23.
210. Acheva, A., et al., *Mechanisms of DNA damage response to targeted irradiation in organotypic 3D skin cultures*. PLoS One, 2014. 9(2): p. e86092.

211. Mayer, P.J., et al., *Age-dependent decline in rejoining of X-ray-induced DNA double-strand breaks in normal human lymphocytes*. *Mutat Res*, 1989. 219(2): p. 95-100.
212. Su, Y., et al., *Analysis of ionizing radiation-induced DNA damage and repair in three-dimensional human skin model system*. *Exp Dermatol*, 2010. 19(8): p. e16-22.
213. Panier, S. and S.J. Boulton, *Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. 15(1): p. 7-18.
214. Indovina, P., G. Rainaldi, and M.T. Santini, *Three-dimensional cell organization leads to a different type of ionizing radiation-induced cell death: MG-63 monolayer cells undergo mitotic catastrophe while spheroids die of apoptosis*. *Int J Oncol*, 2007. 31(6): p. 1473-83.
215. Lanctot, C., et al., *Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions*. *Nat Rev Genet*, 2007. 8(2): p. 104-15.
216. Grigoryev, S.A., Y.A. Bulynko, and E.Y. Popova, *The end adjusts the means: heterochromatin remodelling during terminal cell differentiation*. *Chromosome Res*, 2006. 14(1): p. 53-69.
217. Antonelli, F., et al., *Induction and Repair of DNA DSB as Revealed by H2AX Phosphorylation Foci in Human Fibroblasts Exposed to Low- and High-LET Radiation: Relationship with Early and Delayed Reproductive Cell Death*. *Radiat Res*, 2015. 183(4): p. 417-31.
218. Tokalov, S.V. and A.S. Iagunov, *Radiation-induced cell cycle arrests in Ehrlich ascites carcinoma cells in vivo*. *Radiat Environ Biophys*, 2011. 50(2): p. 265-70.
219. Yunis, R., et al., *Genomic characterization of a three-dimensional skin model following exposure to ionizing radiation*. *J Radiat Res*, 2012. 53(6): p. 860-75.
220. Jantschitsch, C., et al., *Infrared radiation confers resistance to UV-induced apoptosis via reduction of DNA damage and upregulation of antiapoptotic proteins*. *J Invest Dermatol*, 2009. 129(5): p. 1271-9.
221. Menezes, S., et al., *Non-coherent near infrared radiation protects normal human dermal fibroblasts from solar ultraviolet toxicity*. *J Invest Dermatol*, 1998. 111(4): p. 629-33.
222. Vakifahmetoglu, H., M. Olsson, and B. Zhivotovsky, *Death through a tragedy: mitotic catastrophe*. *Cell Death Differ*, 2008. 15(7): p. 1153-62.
223. Cuerda-Galindo, E., et al., *Increased fibroblast proliferation and activity after applying intense pulsed light 800-1200 nm*. *Ann Anat*, 2015. 198: p. 66-72.
224. Seigel, G.M., *Establishment of an E1A-immortalized retinal cell culture*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1996. 32(2): p. 66-8.
225. Peidaee, P., et al., *The Cytotoxic Effects of Low Intensity Visible and Infrared Light on Human Breast Cancer (MCF7) cells*. *Comput Struct Biotechnol J*, 2013. 6: p. e201303015.
226. Karu, T., *Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells*. *J Photochem Photobiol B*, 1999. 49(1): p. 1-17.
227. Van Breugel, H.H. and P.R. Bar, *He-Ne laser irradiation affects proliferation of cultured rat Schwann cells in a dose-dependent manner*. *J Neurocytol*, 1993. 22(3): p. 185-90.
228. Gagnon, R.E., et al., *Brain, spine, and muscle cytochrome Cu-A redox patterns of change during hypothermic circulatory arrest in swine*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2005. 141(3): p. 264-70.



229. Gagnon, R.E., et al., *Temperature, hematocrit, pH, and glucose 4-way ANOVA of cytochrome C oxidase redox status during systemic cold circulatory arrest in swine*. Metab Brain Dis, 2005. 20(2): p. 105-13.
230. Deckbar, D., P.A. Jeggo, and M. Lobrich, *Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2011. 46(4): p. 271-83.
231. Wang, Q., et al., *X-irradiation reduces the proliferation of astrocytes by cell cycle arrest*. Neurosci Lett, 2011. 498(1): p. 78-83.
232. Ianzini, F., et al., *Activation of meiosis-specific genes is associated with depolyploidization of human tumor cells following radiation-induced mitotic catastrophe*. Cancer Res, 2009. 69(6): p. 2296-304.
233. Erenpreisa, J., et al., *The role of meiotic cohesin REC8 in chromosome segregation in gamma irradiation-induced endopolyploid tumour cells*. Exp Cell Res, 2009. 315(15): p. 2593-603.
234. Brent, R.L., *Drug Testing in Animals for Teratogenic Effects. Thalidomide in the Pregnant Rat*. J Pediatr, 1964. 64: p. 762-70.
235. Kong, R. and R. Bhargava, *Characterization of porcine skin as a model for human skin studies using infrared spectroscopic imaging*. Analyst, 2011. 136(11): p. 2359-66.
236. Goodarzi, A.A., T. Kurka, and P.A. Jeggo, *KAP-1 phosphorylation regulates CHD3 nucleosome remodeling during the DNA double-strand break response*. Nat Struct Mol Biol, 2011. 18(7): p. 831-9.
237. Tjeertes, J.V., K.M. Miller, and S.P. Jackson, *Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells*. EMBO J, 2009. 28(13): p. 1878-89.
238. Ayrapetov, M.K., et al., *DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. 111(25): p. 9169-74.
239. White, D.E., et al., *KAP1, a novel substrate for PIKK family members, colocalizes with numerous damage response factors at DNA lesions*. Cancer Res, 2006. 66(24): p. 11594-9.
240. Godon, C., et al., *PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility*. Nucleic Acids Res, 2008. 36(13): p. 4454-64.
241. Freifeld, D. and B. Trumbo, *Matching of Single-Strand Breaks to Form Double-Strand Breaks in DNA*. Biopolymers, 1969. 7(5): p. 681-+.
242. Orthaus, S., et al., *Assembly of the inner kinetochore proteins CENP-A and CENP-B in living human cells*. Chembiochem, 2008. 9(1): p. 77-92.
243. Ohzeki, J., et al., *CENP-B box is required for de novo centromere chromatin assembly on human alphoid DNA*. J Cell Biol, 2002. 159(5): p. 765-75.
244. Tomascik-Cheeseman, L., et al., *CENP-B is not critical for meiotic chromosome segregation in male mice*. Mutat Res, 2002. 513(1-2): p. 197-203.
245. Hudson, D.F., et al., *Centromere protein B null mice are mitotically and meiotically normal but have lower body and testis weights*. J Cell Biol, 1998. 141(2): p. 309-19.
246. Howman, E.V., et al., *Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(3): p. 1148-53.

247. Zhang, H.X., et al., *[Relationship between CENP-B gene expression and the cell cycle]*. Shi Yan Sheng Wu Xue Bao, 1995. 28(3): p. 291-8.
248. Saxena, A., et al., *Centromere proteins Cenpa, Cenpb, and Bub3 interact with poly(ADP-ribose) polymerase-1 protein and are poly(ADP-ribosyl)ated*. J Biol Chem, 2002. 277(30): p. 26921-6.
249. Fry, A.M., P. Meraldi, and E.A. Nigg, *A centrosomal function for the human Nek2 protein kinase, a member of the NIMA family of cell cycle regulators*. EMBO J, 1998. 17(2): p. 470-81.
250. Calles, C., et al., *Infrared A radiation influences the skin fibroblast transcriptome: mechanisms and consequences*. J Invest Dermatol, 2010. 130(6): p. 1524-36.
251. Chen, A.C., et al., *Effects of 810-nm laser on murine bone-marrow-derived dendritic cells*. Photomed Laser Surg, 2011. 29(6): p. 383-9.
252. Huang, Y.Y., et al., *Biphasic dose response in low level light therapy*. Dose Response, 2009. 7(4): p. 358-83.
253. Huang, Y.Y., et al., *Biphasic dose response in low level light therapy - an update*. Dose Response, 2011. 9(4): p. 602-18.
254. Bottero, V., et al., *Monitoring NF-kappa B transactivation potential via real-time PCR quantification of I kappa B-alpha gene expression*. Mol Diagn, 2003. 7(3-4): p. 187-94.
255. Hartel, M., et al., *Randomized clinical trial of the influence of local water-filtered infrared A irradiation on wound healing after abdominal surgery*. British Journal of Surgery, 2006. 93(8): p. 952-960.
256. Hopkins, J.T., et al., *Low-level laser therapy facilitates superficial wound healing in humans: A triple-blind, sham-controlled study*. J Athl Train, 2004. 39(3): p. 223-229.
257. Piazena, H., et al., *Effects of water-filtered infrared-A and of heat on cell death, inflammation, antioxidative potential and of free radical formation in viable skin--first results*. J Photochem Photobiol B, 2014. 138: p. 347-54.
258. Al-Watban FAH, Z.Z., *Dosimetry-related wound healing response in the rat model following helium neon laser LLLT*. Laser Ther, 1994: p. 119-124.
259. Amat, A., et al., *Modification of the intrinsic fluorescence and the biochemical behavior of ATP after irradiation with visible and near-infrared laser light*. J Photochem Photobiol B, 2005. 81(1): p. 26-32.
260. Weber, W., *Untersuchungen zur Regulation mitochondrialer Prozesse unter dem Einfluss von nahem Infrarot*, in TU Darmstadt 2013.

---

## Publikationsliste

---

### Publikationen/Vorträge aus dieser Arbeit

#### Poster:

- 15th Annual Meeting of the GBS, Gesellschaft für biologische Strahlenforschung, München 09/2012  
*Influence of near infrared radiation on X-radiation induced cell response in three-dimensional cell cultures*
- 1th Symposium on water-filtered infrared-A (wIRA), Dr. med. h. c. Erwin Braun Stiftung, Darmstadt 04/2023  
*Influence of near infrared radiation on X-radiation induced cell response in three-dimensional cell cultures*
- 16th Annual Meeting of the GBS, Gesellschaft für biologische Strahlenforschung, Darmstadt 09/2013  
*Water-filtered near infrared changes proliferation in skin tissue*

#### Vorträge:

- Herbstsymposium der Dr. h.c. Erwin Braun-Stiftung, Engelberg, Schweiz 10/2013
- Frühlingssymposium der Dr. h.c. Erwin Braun-Stiftung, Engelberg, Schweiz 05/2014
- International Conferences on Laser Applications in Life Sciences (LALS), Ulm 07/2014  
*Beneficial Effects of Infrared-based Hyperthermia/LLLT (Low Level Laser Therapy) on Radiation Therapy*  
(Invited Talk Anja Heselich, Data Anke König)

### Publikationen

- N. Zöller, A. König, M. Butting, R. Kaufmann, A. Bernd, E. Valesky, S. Kippenberger  
„Water-filtered near-infrared influences collagen synthesis of keloid-fibroblasts in contrast to normal foreskin fibroblasts“

### Eingereichte Publikationen

- F. Nikfarjam, K. Beyer, A. König, M. Hofmann, M. Butting, E. Valesky, S. Kippenberger, R. Kaufmann, D. Heidemann, A. Bernd, N. Zöller  
„Influence of Biodentine® - a Dentine Substitute - on Collagen Type I Synthesis in Pulp Fibroblasts in vitro“

### Weitere Publikationen in Vorbereitung

- A. König, N. Zöller, P.G. Layer, A. Heselich  
„Near-infrared A Exposure Changes Cellular Responses to Ionizing Radiation in Human Full Thickness Skin Modells“
- N. Zöller, A. König, M. Butting, R. Kaufmann, A. Bernd, S. Kippenberger  
„Water-filtered near-infrared promotes fibroblast proliferation and migration in wound conditions“

---

## Lebenslauf

---

### Persönliche Daten

Name Anke König  
Geburtstag 07.10.1984  
Geburtsort Frankfurt am Main

### Promotion

Seit 04/2012 Dissertation „Einfluss von naher Infrarotstrahlung in Kombination mit ionisierender Strahlung auf Zellen der Haut“  
Technische Universität Darmstadt - FB Biologie  
Arbeitsgruppe Entwicklungsbiologie und Neurogenetik, Prof. Dr. P. G. Layer

### Studium

08/2010 – 06/2011 Diplomarbeit: „Untersuchungen zum Einfluss naher Infrarotstrahlung und deren Kombination mit ionisierender Strahlung auf retinale 3D-Zellkulturen und Gewebe“  
Technische Universität Darmstadt - FB Biologie  
Arbeitsgruppe Entwicklungsbiologie und Neurogenetik, Prof. Dr. P. G. Layer

10/2005 – 10/2011 Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt  
Abschluss Diplom Biologie

10/2004 – 10/2005 Studium der Rechtswissenschaften an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

### Schulbildung

1995 – 2004 Goethe-Gymnasium, Neu-Isenburg,  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

1990 – 1995 Selma-Lagerlöff-Grundschule, Neu-Isenburg

### Berufstätigkeit

seit 11/2015 wissenschaftliche Mitarbeit in einem stiftungsgeförderten Verbundprojekt (Dr. med. h. c. Erwin Braun Stiftung, Basel, Schweiz) zur Untersuchung der Wirkung von wassergefiltertem Infrarot (wIRA) an Schweinehaut (*in vivo*)  
Universitätsklinikum der Goethe-Universität Frankfurt a.M.  
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie – biochemisches Forschungslabor, Prof. Dr. S. Kippenberger

---

11/2011 – 04/2012 wissenschaftliche Mitarbeit in einem vom Bundesamt für Strahlenschutz  
geförderten Verbundprojekt zur Untersuchung der Wirkung elektromagnetischer  
Felder des Mobilfunks auf humane Fibroblasten (StSch4504)  
Technische Universität Darmstadt - FB Biologie  
Arbeitsgruppe Entwicklungsbiologie und Neurogenetik, Prof. Dr. P. G. Layer

## **Weiterbildung**

10/2012 – 12/2012 Hospitation am Universitätsklinikum Frankfurt, Klinik für Dermatologie,  
Venerologie und Allergologie, Labor für klinische und dermatologische  
Biochemie, Prof. Dr. A. Bernd  
(Kultivierung von humanen Vollhautmodellen, sowie histologische Auf-  
arbeitung)

08/2014 FELASA B - „Course on laboratory animal science ” bei Provadis (englisch)

## **Stipendien und eingeworbene Gelder**

06/2013 – 10/2014 promotionsbegleitendes Stipendium der Dr. med. h. c. Erwin Braun Stiftung,  
Basel, Schweiz

2015 promotionsbegleitende Unterstützung der praktischen Arbeit durch  
Dr. med. h. c. Erwin Braun Stiftung, Basel, Schweiz

11/15 – heute Wissenschaftsstipendium der Dr. med. h. c. Erwin Braun Stiftung, Basel, Schweiz

---

## Danksagung

---

Zu allererst bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Paul G. Layer für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen zu können. Neben der fachlichen Unterstützung möchte ich mich vor allem auch für die Hilfe bei jeglichen organisatorischen Dingen und für das Vertrauen in meine Fähigkeiten bedanken.

Bei Prof. Dr. Marcus Löbrich möchte ich mich nicht nur für die Übernahme des Korreferats bedanken, sondern auch für die bedingungslose Bereitstellung eines Laborarbeitsplatzes in den letzten Monaten meiner praktischen Arbeit.

Dr. Anja Heselich, bei dir fehlen mir vor lauter Dankbarkeit die Worte! Immer, immer, immer bist du für mich da, sei es im Labor, am Telefon oder im Chat und das zu jeder Tages- und Nachtzeit. Du hast mir immer mit Rat und auch mit Tat zur Seite gestanden und einen riesigen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet. Danke für die Hilfe bei all den Stipendienanträgen, die Diskussionen über NIR, wIRA sowie die daraus resultierenden Ergebnisse und vor allem für das geduldige Korrekturlesen dieser schriftlichen Arbeit. Danke für deine Freundschaft!!!

Nicole Kaiser, bei dir bedanke ich mich unendlich dafür, dass du immer geduldig auf mich gewartet und mich nicht alleine im Labor gelassen hast, auch wenn es mal wieder später wurde. Unsere gemeinsamen Fahrten zur Arbeit waren dafür verantwortlich, dass ich jeden Morgen mit einem Lächeln und etwas schlauer im Labor angekommen bin.

Des Weiteren gilt mein Dank Dr. Florian Frohns, Dr. Antonia Frohns, Johanna Kramer und Dr. Jörg Steinfeld für die tolle Zusammenarbeit im Labor und viele fachliche Diskussionen. Auch bei den anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe möchte ich mich ganz herzlich für die großartige Arbeitsatmosphäre bedanken.

Bei Prof. Dr. August Bernd möchte ich mich vor allem für den Vertrauensvorschuss bedanken, den er mir direkt nach unserem ersten Treffen hat zu kommen lassen und für die daraus resultierenden wunderbaren Zusammenarbeit. Bei Dir im B-Labor bin ich von allen mit offenen Armen empfangen worden und bekomme bis heute wahnsinnige Unterstützung von allen. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Manuel Butting für die vielen, vielen geduldigen Lehrstunden und bei Dr. Nadja Zöller für die tolle Zusammenarbeit über diese Doktorarbeit hinaus. Auch der restlichen Besatzung des B-Labors gilt mein tiefer Dank.

Ein weiterer riesen Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dieter Pollet, der mir nicht nur den wichtigsten Kontakt zum Gelingen dieser Arbeit vermittelt hat, sondern auch noch dafür verantwortlich ist, dass ich zum Ende meiner Arbeit noch ein „Zuhause“ hatte. Danke für den Schreibplatz, den vielen Laborplatz, den die Bestrahlungsapparaturen und ich brauchten, um diese Arbeit zu Ende bringen zu können und den Kontakt zu Prof. Dr. August Bernd. Danke Shara Shamal und Christina Dauscher, dass ihr mit mir und meinem ganzen „Kram“ Freundschaft geschlossen habt.

Wie man meiner bisherigen Danksagung entnehmen kann, bin ich während der praktischen Phase meiner Arbeit viel herumgereist. Eine Laborbesatzung, bei der ich mich auch noch unbedingt bedanken möchte, ist die des Labors von Prof. Dr. Marcus Löbrich. Um in einem Labor gut arbeiten zu können, braucht man nämlich nicht nur die Erlaubnis des Chefs, sondern auch die Unterstützung der Mitarbeiter, da man ständig irgendetwas sucht oder irgendwie anderweitig Hilfe braucht. Danke euch allen dafür, dass ihr mich so toll aufgenommen habt.

---

Auch Frau Prof. Dr. Ulrike Nuber und Frau Prof. Dr. Christina Cardoso danke ich für die Erlaubnis Geräte in ihren Laborräumlichkeiten benutzen zu dürfen und den Mitarbeitern der beiden Arbeitsgruppen für die Einführung und die Hilfestellung bei der Benutzung der Geräte.

Für die finanzielle und technischen Unterstützung meiner Arbeit bedanke ich mich bei der Dr. med. h.c. Erwin Braun Stiftung. Mein besonderer Dank gilt hier Prof. Dr. Jan Olaf Gebbers, H.-Werner Müller, Werner Braun und Dr. Helmut Piazena.

Meinen Freunden Christin, Sylvie, Melle, Martha, Lucie, Ralf, Andy und Eric möchte ich dafür danken, dass sie während der letzten Jahre immer zu mir gehalten haben, mich mit aufmunternden Worten zum Durchhalten animiert und dafür gesorgt haben, dass auch das technische Equipment zum Gelingen dieser Arbeit immer einsatzbereit war!

Meinen Eltern Nela und Heinz, meinem Brunder Heiko und meinem Freund Tobias gilt mein allergrößter Dank und meine Bewunderung. Danke, dass Ihr immer an mich geglaubt habt und mir während meiner gesamten Doktorarbeit das Vertrauen entgegen gebracht habt, dass ich das schaffe. Danke für fachliche Unterstützung, euer Verständnis und die Liebe, die Ihr mir gebt. Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen!



---

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

---

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 30. Juli 2016

.....